

Aus dem Pathologischen Institut
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk)
vorgelegt über
den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
(Prof. Dr. von Sandersleben)
am Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

**HISTOLOGISCHE, HISTOCHEMISCHE UND FLUORESCENZ -
MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
FORMALE GENESE DES CEROIDPIGMENTES**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

von
CARL HEINRICH WEISCHER
aus Bonn

München 1975

Aus dem Pathologischen Institut
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk)
vorgelegt über
den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
(Prof. Dr. von Sandersleben)
am Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

**HISTOLOGISCHE, HISTOCHEMISCHE UND FLUORESZENZ -
MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
FORMALE GENESE DES CEROIDPIGMENTES**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

von
CARL HEINRICH WEISCHER
aus Bonn

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. P. Gedigk, Bonn

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546702_0009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	7
<u>II. Schrifttum</u>	9
<u>III. Material, Methode und Versuchsanordnung</u>	17
A. Tiermaterial	17
B. Zusammensetzung und Herstellung der Lipid- Emulsion	17
C. Kontrollversuche	18
D. Hauptversuche	18
E. Nebenversuche	21
<u>IV. Histologische Untersuchungen</u>	22
A. Lichtmikroskopische Untersuchungen	22
B. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	28
C. Auswertung der Fermentnachweispräparate	29
D. Statistische Auswertung	30
E. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	31
<u>V. Makroskopische Befunde</u>	32
<u>VI. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde</u>	33
A. Kontrollversuche	33
B. Hauptversuche	34
C. Nebenversuche	44
<u>VII. Elektronenmikroskopische Befunde</u>	46
<u>VIII. Diskussion</u>	51
A. Welche Eigenfarbe (a), histochemischen, färberischen (b) und fluoreszenzmikroskopischen (c) Eigenschaften weist das entstehende Pigment während seiner Alterung auf?	51
B. Wie erklären sich die färberischen, histochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften des in den Sternzellen gespeicherten Lipids bei der Umwandlung zu einem Lipopigment?	56

C. Welche Beziehungen bestehen zwischen den elektronenmikroskopischen und fluoreszenz-mikroskopischen bzw. histochemischen Befunden der Ceroidgranula?	62
D. Welche Rolle spielen lysosomale Enzyme bei der Ceroidgenese?	64
E. Sind Erythrozyten oder ihre Bestandteile bei der Pigmentgenese beteiligt?	67
<u>IX. Zusammenfassung</u>	70
<u>X. Summary</u>	71
<u>XI. Photographien</u>	72
<u>XII. Literaturverzeichnis</u>	75
<u>XIII. Nachwort</u>	
<u>XIV. Lebenslauf</u>	

I. Einleitung

LILLIE, DAFT und SEBRELL beschrieben 1941 im Rahmen der diätetisch hervorgerufenen Leberzirrhose bei der Ratte ein "coarsely granular", eisen-negatives, sudanophiles Pigment in den Makrophagen der Leber, dem sie wegen seiner wachsartigen Beschaffenheit den Namen Ceroid gaben. Die färbereischen, histochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften dieses Pigmentes wurden von LILLIE, ASHBURN, SEBRELL, DAFT und LOWRY (1942), ENDICOTT und LILLIE (1944) sowie POPPER, GYÖRGY und GOLDBLATT (1944) herausgearbeitet, vorallem die Säurefestigkeit, die Sudanophilie, die gelbe bis braune Eigenfluoreszenz und die Unlöslichkeit in Fettlösungsmitteln. Seit diesen Publikationen ist eine große Zahl von gleichartigen oder ähnlichen Lipopigmenten beschrieben worden, für die eine verwirrende Fülle von Bezeichnungen in der Literatur niedergelegt sind. So findet man z.B. bei THOMPSON (1966) u.a. folgende Benennungen: Säurefeste Pigmente, Ceroid, ceroidähnliche Pigmente, Abnutzungspigment, lipochromes Pigment, Chromolipoid, Lipofuszin, intra-venous-fat pigment u.a.m. .

Die Lipoidkomponente dieser Pigmente stand von Anfang an im Mittelpunkt des Interesses und gab Anlass zu der summarischen Bezeichnung Lipopigment.

In der Literatur wurden Lipopigmente in Zusammenhang mit ischämischen und virusbedingten Lebernekrosen, bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftungen, beim Vitamin E-Mangel, bei der Sprue, in arteriosklerotischen Ulcera, in Ovarien und in lipophagen Granulomen usw. beschrieben. (Ausführliche Literatur siehe bei GEDIGK und FISCHER, 1958; GEDIGK und PIOCH, 1965 und THOMPSON, 1966)

Obwohl das Ceroid mehrfach Gegenstand spezieller Einzeluntersuchungen war, erschien es angebracht, die Entstehung des Pigmentes von den frühesten Entwicklungsstadien an fluoreszenzmikroskopisch, histochemisch und elektronenmikroskopisch zu verfolgen und die zeitlichen Stadien der Pigmentgenese synoptisch zu

vergleichen. Zudem war es von Interesse festzustellen, ob zwischen den fluoreszenzmikroskopischen, histochemischen und elektronenoptischen Befunden an den Ceroidgranula Beziehungen bestehen. Schließlich stellte sich die Frage, ob lysosomale Hydrolasen bei der Pigmentgenese eine Rolle spielen und ob u.U. die Erythrozytenmembran an der Pigmententstehung beteiligt ist.

Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, daß die Ceroidbildung mit der Oxydation und Polymerisation von ungesättigten Fettsäuren im Zusammenhang stehen (HASS, 1938; GEDIGK und FISCHER, 1958; GEDIGK und PIOCH, 1965; THOMPSON, 1969), bot sich der Lebertran mit seinem hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren als Ausgangsmaterial an. Als Untersuchungsorgan wurde die Leber der Ratte gewählt, in der man besonders gut die Pigmentgenese verfolgen kann (WILHELM, 1968).

II. Schrifttum

(Literatur siehe bei GEDIGK, 1958, 1964, 1965 und PEARSE, 1972) Über die Genese lipogener Pigmente liegen in der human- sowie tierärztlichen Literatur eine unübersehbare Anzahl an Arbeiten vor.

Daher ist es notwendig, diese Lipopigmente im einzelnen vorzustellen und gegeneinander abzugrenzen, um das Verständnis unserer Untersuchungen zu erleichtern. Die Lipopigmente stammen entweder ganz oder nur zu einem Teil von den Lipiden ab. Sie setzen sich zu einer großen Klasse zusammen, der viele Namen gegeben wurden. Insgesamt gesehen sind ihre verschiedenen Unterteilungen charakterisiert durch ziemlich unbestimmbare Unterschiede bezüglich ihrer Reaktion mit einer Reihe von histochemischen Nachweisen. Die meisten der eisenfreien Vertreter dieser Klasse werden den "wear and tear pigments" (Syn. braune Atrophie, Abnützungspigment, Lipofuszin) zugeordnet, andere werden als Chromolipoid, Hämofuszin, Cytolipochrom, Lipochrom und als Ceroid beschrieben. Manchmal werden die eisenenthaltenden Lipopigmente als Varianten des Hämosiderins und manchmal getrennt als Cytosiderine betrachtet.

Folgende Vertreter der Lipopigmente seien im einzelnen vorgestellt; nach GEDIGK, 1958, 1964, 1965 und nach PEARSE, 1972; siehe auch dort die Literatur: Lipofuszin, Hämofuszin und Cytolipochrome, Ceroid, Pseudomelanosispigment, eisenenthaltende Lipopigmente und Lipochrome.

Lipofuszine

(Nach PEARSE, 1972)

Diese Pigmente leiten sich von einer Reihe Lipid- oder Lipoproteinursprungssubstanzen ab. Der Vorgang, durch den die Lipofuszine hervorgerufen werden, ist zu einem unbedeutenden Teil eine Oxydation. Schon von VIRCHOW (1847) und von GOLDENBERG (1886) wurde braunes Pigment in verschiedenen Geweben sowie in hypertrophischem und atrophischem Herzmuskeltgewebe beschrieben. LUBARSCH (1902) bezeichnete das braune Pigment, das er in

menschlichem Obduktionsmaterial fand, als Abnutzungspigment oder Abbaupigment. Der Name Lipofuszin wurde durch BORST und HUECK (1912) geprägt. HUECK (1912, 1921), HAMPERL (1934) und SACHS (1943) grenzten das Lipofuszin durch histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von den Melaninen ab. HEIDENREICH und SIEBERT (1955) sowie SIEBERT, DIEZEL, JAHR, KRUG, SCHMITT, GRÜNEBERGER und BOTTKE (1962) analysierten das mit physikalischen Methoden aus dem menschlichen Herzen isolierte Lipofuszin. Sie stellten dabei 20 % Lipide, 50 % Proteine und 30 % eines schwarzen Rückstandes fest, in dem sie ein melaninartiges Material zu erkennen glaubten. Außerdem wiesen sie Phosphor, Schwefel, zyklische Aminosäuren und stickstoffhaltige Basen sowie eine Protease und Esterase nach. GEDIGK und BONTKE (1956) fanden im Lipofuszin in verschiedenen Organen saure Phosphatase und unspezifische Esterase. Lipofuszin soll nach der Ansicht von ASCHOFF (1910) und HUECK (1912) aus "Fettstoffen - und zwar vielleicht aus einer Zersetzung von Lipiden - hervorgehen können".

Alterungsvorgänge wurden für die zunehmende Braunfärbung des Pigmentes verantwortlich gemacht. Diese Ansicht wurde von GEDIGK (1958) durch Experimente mit reinen Methylestern ungesättigter Fettsäuren bestätigt. Nach GEDIGK wurden die ungesättigten Fettsäureester in vivo und in vitro durch Oxidation und Polymerisation in lipofuszinartige, gelbbraune und schließlich braunschwarze Pigmente umgewandelt, die allmählich ihre Sudanophilie verloren und dann in Fettlösungsmitteln unlöslich waren. Durch die Mischung der ungesättigten Lipide mit Proteinen wurde der oxydative Umbau erheblich beschleunigt. (GEDIGK, 1958). Untersuchungen von GEDIGK und FISCHER (1959) am Vitamin-E-Mangelpigment, das in wesentlichen Eigenschaften mit den Lipofuszin übereinstimmt, ergaben schließlich, daß es sich in den Muskelfasern aus ungefärbten, eiweiß- und lipidhaltigen Vorstufen allmählich zu gelbbraunen, sudanophilen und fluoreszierenden Pigmentgranula entwickelt. Der Entstehung und Alterung des Pigmentes lag eine zunehmende Ablagerung sowie Oxydation und Polymerisation ungesättigter Lipide in stoffwechselaktiven

Zytoplasmabezirken zugrunde (GEDIGK und FISCHER, 1959).

Zur Histochemie der Lipofusazine:

(Nach PEARSE, 1972)

Die Löslichkeit in Fettlösungsmitteln des Pigmentes verringert sich entsprechend seiner Fähigkeit, Fettfarbstoffe zu lösen.

Die Zahl der Säuregruppen, die frei für eine Bindung mit basischen Farbstoffen sind, beginnt, sobald die Oxydation einsetzt, zuzunehmen. Zu diesem Zeitpunkt dürfte die PLASMAL-Reaktion positiv werden. Die Reaktion bleibt positiv nur für eine kurze Dauer, obgleich die vergleichbare PFAS-Reaktion für eine längere Zeitdauer bestehen bleibt. Die Ursache für die positive PAS-Reaktion ist nur noch ungeklärt in den intermediären Stadien der Lipidoxidation. Es bedeutet sicherlich nicht, wie viele Autoren annehmen, daß hinsichtlich des Lipides dieses zu den kohlenwasserstoffhaltigen GLYCOLIPID (Cerebroside) -Gruppen gehört. Man weiß, daß Aldehyde von nicht kohlenwasserstoffhaltigen Gewebekomponenten, ungesättigten Phosphatiden, durch den Einfluß von Perjodsäure erzeugt werden können. Desweiteren nimmt man an, daß solche Aldehyde nicht von allen phosphatidhaltigen Komponenten durch diese Methode hergestellt werden können.

Die Eigenschaft der Säurefestigkeit beruht auf dem Grad, auf dem die Untersuchung durchgeführt wird und auf der Auslegung, was als säurefest anzusehen ist. BERG (1953) zeigte, daß die Säurefestigkeit von Ceroid färbungsspezifisch ist. Sie konnte nur mit basischem Fuchsin nachgewiesen werden. Der Mechanismus der Säurefestigkeits-Reaktion wurde durch LARTIQUE und FITE (1962) untersucht. Sie folgerten, im Einklang mit LAMANNA (1946), daß die Wirkung des Phenols nur darin bestehen könnte, die Lipidlöslichkeit des benutzten Farbstoffes zu vermehren.

Die Säurefestigkeit darf nicht benutzt werden, um zwischen Lipofuszin und Ceroid zu unterscheiden.

Von dem Lipofuszin und dem Vitamin-E-Mangelpigment, die gleichfalls oxydierte und polymerisierte ungesättigte Lipide enthalten, unterscheidet sich das Ceroid vornehmlich durch seinen geringen Eiweißgehalt, der mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielt und unter Umständen auch ganz fehlt (GEDIGK und FISCHER, 1958).

HÄMOFUSZIN und CYTOLIPOCHROME

1889 wurde das Hämfuszin von v. RECKLINGHAUSEN bei verschiedenen Fällen von Hämochromatose beschrieben. HUECK (1921) grenzte das besonders im Bereich von Blutungen gefundene Hämfuszin von den beiden anderen hämatogenen Pigmenten, dem Hämosiderin und dem Hämatoidin ab, und er legte dar, daß es in wesentlichen Punkten mit der Gruppe der fetthaltigen Abnützungspigmente übereinstimmte. Unter dem Namen "CEROID" wurde dieses Pigment zwei Jahrzehnte später erneut beschrieben.

GILLMANN und GILLMANN (1945) bezeichneten ein Pigment als Cytolipochrom, das die Charakteristika des Hämfuszins aufwies und das sie in Lebern von Pellagrakranken fanden. Diese Bezeichnung wird allgemein verurteilt. Es liegen keine Anhaltspunkte vor, so wie dieses Pigment beschrieben wurde, daß die Einführung einer neuen Bezeichnung rechtfertigt, sogar dann nicht, wenn es den Vorzug histochemischer Genauigkeit hätte (PEARSE, 1972).

CEROID

(Nach PEARSE, 1972)

Dieses Pigment wurde zuerst von LILLIE und Mitarbeitern (1941, 1942) und durch EDWARDS und WIGHT (1941) beschrieben. Die Autoren fanden dieses Pigment in zirrhatischen Lebern von Tieren, die unzureichendes Futter erhielten. EDWARDS und DALTON (1942) beschrieben später ein ähnliches Pigment in Lebern von Mäusen, die mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt wurden. WOLF und PAPPENHEIMER (1945) und PAPPENHEIMER und VICTOR (1946) beschrieben das Auftreten eines Pigmentes, das sie mit dem Ceroid

auf Grund seiner Säurefestigkeit in Zusammenhang brachten und das in einer großen Mannigfaltigkeit in menschlichen Geweben vorkam. Sie nahmen an, daß seine Entstehung durch Vitamin-E-Mangel bewirkt wurde. ENDICOTT und LILLIE (1944) setzten die Haupteigenschaften des Ceroidpigmentes sowie die Unterscheidungsmerkmale zu anderen Pigmenten - wie dem Hämfuszin - fest.

Ceroid wurde als ein, in Form von gelben Kügelchen, mit einem Durchmesser von 1 - 20 μ , säurefestes Material beschrieben. Dieses säurefeste Material wurde gewöhnlich in Phagozyten und in Form von basophilen Rändern rund um große Fettkügelchen beobachtet. In Gefrier- als auch Paraffinschnitten färbte sich das Ceroid gut mit fettlöslichen Farbstoffen. LILLIE beobachtete, daß die Eigenschaft der Säurefestigkeit von einigen Lipofuszinin geteilt wurde - oder wie man sagen sollte - geteilt wird von Lipofuszinin in einigen ihrer Entwicklungsstadien.

Man kann daher die Säurefestigkeit nicht als Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Pigmenten heranziehen. LILLIE behauptete jedoch, daß eine Unterscheidung mittels der negativen Reaktionen mit SCHMORL's Test gemacht werden kann. Er erwähnte jedoch nicht in dieser Arbeit (1948) die PAS-Reaktion, sondern LEE (1950) beobachtete, daß das Ceroid mit dieser Reaktion in Ratten- und Mäuselebern unterschiedlich positiv war. LEE beobachtete bei dieser Reaktion, daß manchmal nur ein Teil des Pigmentes gefärbt war, und er schloß daraus, daß, obgleich dieses Pigment säurefeste und fettanfärbende ähnliche Eigenschaften aufwies, daß Ceroid aufgrund seiner Verschiedenartigkeit sich mit der Eisenreaktion, der Perjodsäure, Leukofuchsin, Schiff-Reaktion, basischem Fuchsin und Pyronin sowie Methylgrün anzufärben, ein unterschiedliches Gemisch von Substanzen sein dürfte.

McMANUS (1949) stellte fest, daß Ceroid mit der Hotchkiss (PAS)- und Feulgenreaktion eine positive Reaktion für Kohlenwasserstoffkomponenten ergab, "sowohl mit als auch ohne Säurehydrolyse". Diese letzte Behauptung bedarf jedoch einer Klärung, da beide Reaktionen ohne Säurehydrolyse nur Pseudoplas-

malreaktionen sind. WOLMAN und SOSHAN (1960) untersuchten künstliche "CHROMOLIPOIDE", die durch eine Injektion mit neutralisiertem Lebertranöl bei Ratten hervorgerufen wurden. Man fand, daß diese Pigmenteinschlüsse sich mit der Feulgen-Reaktion für DNS anfärbten. Diese Komponente wurde jedoch durch die Spektrophotometrie ausgeschlossen, die deutlich die Anwesenheit von Plasmalogenen anzeigte.

Nach WOLMAN und ZAIDL (1962) begünstigt hoher Sauerstoffdruck die Bildung von Chromolipoiden. Alle Lipide verhalten sich in einem frühen Oxydationsstadium, ähnlich dem Ceroid. Die positive PAS-Reaktion zeigt nicht unbedingt die Anwesenheit von Kohlenwasserstoffen weder in Ceroid noch in Lipofuszin an. Aber die Resultate, die man durch Hemmtechniken erhält, lassen vermuten, daß einige von den positiven Gruppen die Anwesenheit von Polysacchariden anzeigen. Nach GEDIGK und PIOCH (1965) wurde von CIACCIO (1950, 1951), CASSELMAN, PEARSE (1955) sowie GEDIGK und FISCHER (1958, 1959) die positive PAS-Reaktion der Lipopigmente auf Oxydationsprodukte ungesättigter Lipide bezogen, da es bekannt ist, daß bei einer vorsichtigen Oxydation ungesättigter Fettsäuren an den Doppelbindungen benachbarte Hydroxylgruppen oder Oxyketogruppen entstehen können, die sich bei der Perjodsäure- und Leukofuchsinreaktion genauso verhalten wie die benachbarten Hydroxylgruppen von Polysacchariden.

Säurefestes, gelblich-braun fluoreszierendes Pigment wurde von MASON und HARTSHOUGH (1951) beobachtet, das bei Vitamin-E-Mangel bei Ratten und Nerzen auftrat; ebenfalls wurde es von ROBINSON und COEY (1951) bei Schweinen nachgewiesen. 1955 war TAPPEL in der Lage, gelbbraune Copolymere des Ceroids durch in vitro Oxydation von ungesättigten Fetten bei Anwesenheit von Proteinen, besonders von Hämoglobinen, zu erzeugen. Ceroid wurde u.a. im Atherom (BURT, 1952), in Coronararterien (SCHORNAGEL, 1956), in Fluorocyten in der Leber (SCHMIDT, 1953) und in der Hämochromatose (WEBER, 1954) beobachtet.

PSEUDOMELANOSE-PIGMENT

(Nach PEARSE, 1972)

Dieses Pigment wurde meist ausschließlich in Makrophagen der Lamina propria des großen Intestinuums und des Blinddarms gefunden. HUECK (1912), HENSCHEN und BERGSTRAND (1913) und DALLDORF (1927) betrachteten das Pigment als Zwischenstufe von Melanin und Lipofuszin, während PICK (1911), LUBARSCH und BORCHARDT (1929) sowie PICK und BRAHN (1930) es als echtes Melanin betrachteten. PICK's letzte Theorie, daß aromatische Proteinuntergangsprodukte, wenn sie vom großen Intestinuum absorbiert werden, in Melanin durch ein im Bindegewebe vorhandenes tyrosinase-ähnliches Enzym umgewandelt werden, wurde von STEWART und HICKMANN (1931) akzeptiert.

Alle diese Pigmente, die PEARSE (1972) im Falle der Pseudomelanose des Colons und des Blinddarms untersuchte, waren bei der Turnbull- und Berlinerblau-Reaktion negativ, und er stimmte mit STEWART und HICKMANN's Entscheidung überein, daß dieses Pigment nicht vom Hämoglobin abstamme.

Eisenhaltige Pigmente

(Nach PEARSE, 1972)

Wenn es auch hier nicht angebracht ist, über die Differentialdiagnose der Hämosiderine eine Betrachtung anzustellen, so ist das gelegentliche Auftreten von meist identisch aber nicht fluoreszierenden, eisenhaltigen Granula in Lipofuscinansammlungen erwähnenswert. Es ist möglich, diese als reines Hämosiderin anzusehen, aber es ist eher wahrscheinlich, daß sie für die Verbindung von Eisensalzen mit dem Lipofuszin in einer seiner Entwicklungsstufen verantwortlich sind (PEARSE, 1972).

LIPOCHROME

(Nach PEARSE, 1972)

Nach der Definition sind dies Lipide, die in einer Lösung gefärbte Kohlenwasserstoffe von allgemein auftretenden Carotinoid-Reihen enthalten. In frischen Geweben ist die Anwesenheit von Carotinoiden häufig augenscheinlich genug und zwar durch

brillianten, gelb und roten Farben, die sie ihnen verleihen.

Die Carotinoiden Pigmente

(Nach PEARSE, 1972)

Was auch immer die Natur des Lipidanteiles des Lipochromes ist - und diese dürften in weiten Grenzen schwanken - die Diagnose des Pigmentes beruht auf dem Nachweis der Carotinoide. Nach KARRER und JUCKER (1950) sind ungefähr 80 natürliche Carotinoide bekannt. Sie alle gehören chemisch eng zueinander. Sie zählen zu der Klasse der Polyene (Polyisoprene), deren Hauptcharakteristikum es ist, eine große Zahl konjugierter Doppelbindungen zu besitzen. Da Carotinoide extrem löslich in Fettlösungsmitteln sind, werden sie selten in Paraffinschnitten, außer, wenn sie als Chromoproteine auftreten, gefunden. Carotinoide wurden histochemisch mittels bestimmter Farbreaktionen nachgewiesen. Sie ergeben grüne, blaue oder violette Farben mit einer Vielzahl von starken Säuren wie z.B. Schwefelsäure, Salzsäure, Phosphorsäure, Perchlorsäure, Ameisensäure und Trichloressigsäure sowie blaue Farben mit den Chloriden des Antimons und Arsens.

Die Carotinoide und das Vitamin A zeigen grüne Fluoreszenzen im ultra-violetten Licht. In der Routinehistochemie sind die Carotinoidpigmente von geringer Bedeutung, obgleich in der Forschung ihr Interesse augenscheinlich größer ist (PEARSE, 1972).

III. Material, Methode und Versuchsanordnung

A. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten 68 3-5 Monate alte und 210 bis 460 g schwere männliche Wistarratten. Alter, Gewicht und Versuchsdauer sind in Tabelle I aufgeführt. Die Tiere erhielten während der Versuchsdauer Würfelfutter und Wasser ad libitum. Die Tötung erfolgte durch eine überdosierte Äthernarkose.

B. Zusammensetzung und Herstellung der Lipidemulsion

Zur Erzeugung des Lipopigments wurde eine in vitro stabile Öl-in-Wasser-Emulsion benötigt. Die Stabilität der Emulsion wurde durch Zusatz von einem Emulgator (Lecithin) erhöht. Um etwaige Nebenwirkungen zu vermeiden, wurde die Konzentration des Emulgators gering gehalten.

Zusammensetzung der Emulsion

- 1) Lebertran 10 ml
- 2) Lecithin 1 ml als Emulgator (von Firma Merck)
- 3) Aqua dest. ad 100 ml als Dispersionsmittel

Zur Verwendung kam Lebertran aus der Fangsaison 1971/72 der Firma Andra-Noris-Zahn AG, Frankfurt/M., der den Bestimmungen des DAB 7 entspricht.

Die chemische Zusammensetzung des Lebertrans wurde vom Lieferanten wie folgt angegeben:

Jodzahl: 155,6

Säurezahl: 0,61

Verseifungszahl: 186,3

Vitamin A: 85a I.E./Gramm

Vitamin D: 85 I.E./Gramm

Zur Erzeugung einer möglichst feintropfigen Lipoidemulsion wählten wir folgendes Verfahren. Mit Hilfe eines Ultra Turax der Firma Schütt jun. wurden 17,8 g Aqua dest, 2 g Lebertran und 0,2 g Lecithin bei 10.000 U/Min. 3 Minuten lang voremulgiert.

Die danach mit einem Objektmikrometer (Leitz) durchgeführte Messung ergab eine durchschnittliche Emulsionströpfchengröße von $20\ \mu$. Die Emulsion wurde danach $8\ \frac{1}{2}$ Std. in einem Ultraschallgerät der Firma Lehfelddt mit einer Frequenz von ca. 34 kHz beschallt. Die Emulsion hatte daraufhin einen Fetttröpfchendurchmesser von $5-10\ \mu$.

Die oben erhobene Anforderung einer möglichst feindispersen Emulsion kann nur mit Ultraschall im Frequenzbereich über 20 kHz (Din 54119) erreicht werden. Das benutzte Ultraschallgerät entsprach dieser Forderung. Um die Stabilität der Emulsion zu prüfen, wurde ein Teil im Kühlschrank bei 4°C über mehrere Wochen aufbewahrt und der Tröpfchendurchmesser mit dem Objektmikrometer in regelmäßigen Zeitabständen untersucht. Es zeigte sich, daß der Fetttröpfchendurchmesser in der ersten Woche nach der Herstellung linear zunahm d.h. die Tröpfchengröße vergrößerte sich pro Tag um $1\ \mu$.

C. Kontrollversuche

Um etwaige Nebenwirkungen des Emulgators der Lipidemulsion ausschließen zu können, wurden einem Tier 4 ml einer 2%igen Lecithinlösung in die Vena femoralis injiziert. Die Tötung dieses Tieres erfolgte nach 5 Tagen. Außerdem wurden drei nicht injizierte Kontrolltiere untersucht. Zwei Tiere waren 3 Monate, ein Tier 4 Monate alt.

D. Hauptversuche

(5 Minuten bis 12 Wochen)

4 ml der beschriebenen 10%igen stabilisierten, nicht isotonischen Lebertran-Wasser-Emulsion wurden während einer leichten Äthernarkose in die freigelegte Oberschenkelvene der Versuchstiere injiziert.

Um die frühen Phasen der Lipidaufnahme in den Sternzellen zu erfassen, wurden speziell für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an 6 Ratten folgende Versuche durchgeführt:

In Abständen von 5, 15, 30 Minuten und 1, 6, 12 Stunden wurde je einem Tier 4 ml der oben beschriebenen Lebertran-Wasser-Emulsion in die Oberschenkelvene injiziert.

Für die histochemischen, färberischen, fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden je zwei, drei bzw. vier Tiere pro Zeitabschnitt 4 ml der erwähnten Lipidemulsion injiziert. Die Zeitabschnitte betrugen nunmehr 1, 2, 3, 4, 5, 6 Tage sowie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 Wochen. Tabelle I gibt Aufschluß über die Anordnung der Hauptversuche.

Tabelle I

Übersicht über die Anordnung der Hauptversuche für die histochemischen, färberischen, fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Anzahl der Tiere	Menge der Lipid- emuls.	Gewicht	Alter	Zeitabschn.	Untersuchung
1	4ml	440 g	3 Mon.	5 Min.	EM
1	4ml	450 g	3 Mon.	15 Min.	EM
1	4ml	450 g	3 Mon.	30 Min.	EM
1	4ml	440 g	3 Mon.	1 Std.	EM
1	4ml	440 g	3 Mon.	6 Std.	EM
1	4ml	440 g	3 Mon.	12 Std.	EM
3	4ml	ø250 g	3 Mon.	1.Tag	EM/H/F/FM
3	4ml	ø250 g	3 Mon.	2.Tag	EM/H/F/FM
3	4ml	ø250 g	3 Mon.	3.Tag	EM/H/F/FM
3	4ml	ø250 g	3 Mon.	4.Tag	EM/H/F/FM
3	4ml	ø250 g	3 Mon.	5.Tag	EM/H/F/FM
2	4ml	ø250 g	3 Mon.	6.Tag	EM/H/F/FM
4	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	1.Woche	EM/H/F/FM
4	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	2.Woche	EM/H/F/FM
3	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	3.Woche	EM/H/F/FM
3	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	4.Woche	EM/H/F/FM
4	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	5.Woche	EM/H/F/FM
4	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	6.Woche	EM/H/F/FM
4	4ml	210-450 g	3/4/5 Mon.	7.Woche	EM/H/F/FM
2	4ml	ø460 g	5 Mon.	8.Woche	EM/H/F/FM
2	4ml	ø460 g	5 Mon.	9.Woche	EM/H/F/FM
2	4ml	ø460 g	5 Mon.	10.Woche	EM/H/F/FM
2	4ml	ø460 g	5 Mon.	11.Woche	EM/H/F/FM
2	4ml	ø460 g	5 Mon.	12.Woche	EM/H/F/FM

Anmerkung:

(Rubrik: Untersuchung) EM: Elektronenmikroskop. Unters.

H : Histochemische Unters.

F : Färberische Unters.

FM: Fluoreszenzmikroskopische Unters.

E. Nebenversuche

Injektion von Erythrozytenstroma

Nach PRANKERD (1961) läßt sich bei pH 6 oder darunter das Erythrozytenstroma leicht herunterzentrifugieren. Das gewonnene Zentrifugat enthält noch Hämoglobin, das bei einem pH von 4,5, nahe dem isoelektrischen Punkt der Erythrozytenmembranen, durch wiederholtes Waschen herausgelöst werden kann. Jedoch bleiben 2% des Hämoglobins nach wie vor an das Stroma gebunden.

Herstellung des Erythrozytenstromas:

Gewaschene Erythrozyten vom Menschen wurden mit Michaelis-puffer pH 4,6 hämolysiert, anschließend mehrfach bei 3000 U/Min. zentrifugiert und mit Aqua dest. gewaschen. Das so gewonnene Stroma wurde in physiologischer NaCl-Lösung mit 0,1 ml Penicillin-G ("Höchst"/Frankfurt/M.) suspendiert und 1 ml der Suspension in die Oberschenkelvene injiziert. Wir wählten den 7. Tag zur Untersuchung, um sicher zu gehen, ein fortgeschrittenes, den Hauptversuchen (1 Wochen-Versuche) vergleichbares, Stadium einer eventuellen Pigmentgenese untersuchen zu können. Zur Untersuchung kamen 5 drei Monate alte, ca. 300 g schwere Tiere.

IV. Histologische Untersuchungen

Sofort nach der Tötung wurde die Leber dem Versuchstier entnommen.

A. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Von einem Leberlappen wurden unfixierte Kryostatschnitte mit einer Schnittdicke von 6-7 μ hergestellt. Ein anderer Teil der lebensfrisch gewonnenen Leber wurde in einer 4%igen Formalin-Calcium-Lösung 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank fixiert und 6-7 μ dicke Gefrierschnitte angefertigt. Ein anderer Leberlappen wurde nach der Fixation in Paraplast eingebettet.

Histochemische Reaktionen und Färbungen

Die folgend aufgeführten Färbungen und histochemischen Reaktionen wurden nach den Vorschriften von BARKA und ANDERSON (1963), GEDIGK und TOTOVIC (1964), KISZELY und POSALAKY (1964), THOMPSON (1966) und PEARSE (1960, 1972) durchgeführt.

- 1) Ölrotfärbung (am fixierten Gefrierschnitt)
- 2) Färbung mit Sudanschwarz (am Paraffinschnitt)
- 3) Nilblausulfatfärbung
- 4) Perameisensäure-Schiff (PFAS)-Reaktion
- 5) Perameisensäure-Schiff (PFAS)-Reaktion nach Bromierung
- 6) Ziehl-Neelsen-Reaktion
- 7) Luxolfastbluefärbung
- 8) PAS-Reaktion
- 9) PAS-Reaktion nach Acetylierung
- 10) PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung
- 11) PAS-Reaktion nach Diastase
- 12) PAS-Reaktion nach Hyaluronidase
- 13) Eisenbindung nach HALE
- 14) BERLINER-BLAU-Reaktion
- 15) Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC
- 16) " " " nach HgCl_2 -Blockierung
- 17) " " " nach KCN-Blockierung
- 18) Ninhydrin-Schiff-Reaktion
- 19) Hämatoxilin-Eosinfärbung

Fermentnachweise

- 20) saure Monophosphoesterase nach GOMORI/Metallsalzmethode
 21) " " " BARKA und ANDERSON/Azofarbstoffmethode
 22) alkalische Phosphatase
 23) unspezifische Esterase n. PEARSE mod.n. BURSTONE
 24) Lipase nach BARKA u. ANDERSON

Erläuterungen zu den angewandten Methoden

1) Färbung mit Ölrot (am fix. Gefrierschnitt)

Diese Färbung, eingeführt durch LILLIE (1944) färbt neutrale Fette im Gewebe rot an.

2) Sudan-Schwarz-Färbung (am Paraplastschnitt)

In Paraffinschnitten färben sich gebundene Lipide und Proteine mit Sudanschwarz braun bis schwarz an, da durch die Paraplasteinbettung alle löslichen Fettsubstanzen herausgelöst wurden.

3) Nilblausulfatfärbung (am Paraplastschnitt)

Nach LIPP (1959) beruht die Methode auf der Eigenschaft des Oxazin-Anteiles der Nilblau-Lösung, stabile blaue oder blaugüne Verbindungen mit sauren Lipiden, insbesondere mit Esterphosphatiden zu bilden. Andere Lipide werden gleichzeitig vom Oxazon-Anteil in der Nilblaulösung rot oder durch beide Nilblau-Derivate in Mischfarben zwischen blau und rot angefärbt.

Nilblaulösungen färben (Literatur bei LIPP, 1959; THOMPSON, 1966) weiterhin aber auch alle anderen basophilen Gewebselemente mit blauen Farbtönen an. Unter den basophilen Gewebekomponenten, (THOMPSON, 1966), die sich in dieser Weise anfärben, sind säurebildende Lipide wie auch freie Fettsäuren, Phospholipide und bestimmte Bestandteile von einigen Pigmentablagerungen von lipogenem Typ. Viele lipogene Pigmentablagerungen enthalten säurebildendes Fett und nicht lipidhaltige basophile Bestandteile. Sie weisen verschiedene Basophiliegrade auf, wenn sie mit basischen Farbstoffen anderer Art als Nilblau gefärbt werden. Diese Basophilie zeigt sowohl Säurefestigkeit von einigen Lipopigmentarten als auch die wahrscheinliche Anwesenheit von freien Fettsäurebestandteilen. Einige Beispiele solcher Pigmente, die sich mit Kation und Salzen der Iminobase von

Nilblau anfärben dürften, sind u.a. Ceroid und intravenöses Fettpigment (THOMPSON, 1966).

4) Perameisensäure-Schiff-(PFAS)-Reaktion (am Paraplastschnitt)
Nach GEDIGK (1952), LILLIE und BANGLE (1954) lassen sich durch diese Methode Äthylenverbindungen darstellen, die durch die Einwirkung der Perameisensäure zu Schiffpositiven Aldehyden oxydiert werden. Ebenfalls mit der Schiff'schen Base reagieren Sulfon- und Sulfinssäuren, die bei der Perameisensäure-oxydation aus Cystin entstehen. Es kann jedoch als gesichert gelten (GEDIGK und PIOCH, 1965), daß mit der Perameisensäure-Schiff-Reaktion im Ceroid lediglich ungesättigte Fettsäuren bzw. deren Ester und nicht SH-Gruppen dargestellt werden.

5) Perameisensäure-Schiff-(PFAS)-Reaktion nach Bromierung
Diese Reaktion wurde von LILLIE (1952) als Kontrollreaktion zur Perameisensäure-Schiff-(PFAS)-Reaktion eingeführt. Wenn Gewebeschnitte mit einer Lösung von Brom in Tetrachlorkohlensstoff vorbehandelt werden, so lagert sich Brom an konjugierte Doppelbindungen an. Die dabei entstehende gesättigte Verbindung ist für die Perameisensäure nicht angreifbar, so daß die nachfolgende Schiff'sche Reaktion negativ ausfällt.

6) Ziehl-Neelsen-Reaktion

Nach GEDIGK und PIOCH (1965), PEARSE (1972), CASSELMAN (1951) ist die Säurefestigkeit einer Struktur als Anzeichen für die Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren von hohem Molekulargewicht bzw. ihrer Oxydationsprodukte zu werten. Diejenigen Partikel in den Geweben, die trotz HCl-Alkoholnachbehandlung mit Carbolfuchsin angefärbt bleiben, d.h. sich nicht entfärben lassen, sind als säurefest zu betrachten.

7) Luxol-Fast-Blue-Färbung

Nach GEDIGK und PIOCH (1965) werden durch diese Färbung nicht nur Phospholipide, Lipoproteide oder cholinhaltige Verbindungen dargestellt (PEARSE, 1960, 1972), vielmehr reagieren auch reine Methylester ungesättigter Fettsäuren bei einem bestimmten Oxydations- und Polymerisationsgrad mit diesem Kupfer-

phtalocyaninfarbstoff. Lipopigmentgranula sind in der Regel nach Behandlung mit dem Kupferphtalocyaninfarbstoff nicht einheitlich blau gefärbt.

8) PAS-Reaktion (am Paraplastschnitt)

Mit dieser Reaktion weist man im histologischen Schnitt Polysaccharide, neutrale und saure Mucopolysaccharide, Muco- und Glycoproteide sowie Glykolipide nach (GEDIGK, 1952). Alpha-Glykolgruppen in Kohlenhydraten und kohlenhydrathaltigen Verbindungen werden durch Perjodsäure oxydiert. Die entstandenen Aldehyde werden mit Schiff'schen Reagens nachgewiesen. Allerdings wurde die positive PAS-Reaktion der Lipopigmente von GEDIGK und FISCHER (1958) auch auf Oxydationsprodukte ungesättigter Lipide bezogen, da es bekannt ist, daß bei vorsichtiger Oxydation ungesättigter Fettsäuren an den Doppelbindungen benachbarte Hydroxyl- oder Oxyketogruppen entstehen können, die sich bei der Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion genau so verhalten wie die benachbarten Hydroxylgruppen von Polysacchariden. Es sei noch vermerkt, daß Neutralfette bei der Einbettung der Gewebe extrahiert wurden. Somit können Doppelbindungen nur in gebundenen Lipoiden enthalten sein.

9) PAS-Reaktion nach Acetylierung (mit Pyridin)

Diese Kontrollreaktion wird durchgeführt, um die durch die PAS-Reaktion darstellbaren alpha-Glykole von den Äthylengruppen zu unterscheiden. Hierbei werden reaktionsfähige Hydroxylgruppen durch Essigsäureanhydridlösung acetyliert und können dann nicht mehr durch Perjodsäure oxydiert werden. Hingegen werden ungesättigte Carbonsäuren, da ihre Doppelbindungen bei der Acetylierung nicht angegriffen werden, oxydiert. Bei der Reaktion haben außer den Carbonsäuren alle PAS-positiven Substanzen ihre Reaktionsfähigkeit verloren. So lassen sich ungesättigte Fettsäuren von den alpha-Glykolen unterscheiden.

10) PAS-Reaktion nach Acetylierung und Verseifung

Bei dieser Kontrollreaktion werden aus den veresterten Glykolen die Acetylgruppen durch schwaches Alkali entfernt. Die dabei

erneut entstandenen reaktionsfähigen Hydroxylgruppen werden mit der PAS-Reaktion nachgewiesen.

11) PAS-Reaktion nach Diastase-Behandlung

Glykogen läßt sich aus den Gewebeschnitten mittels Diastase entfernen. Wenn die PAS-Reaktion nach Diastase negativ ausfällt, so kann daraus geschlossen werden, daß in den zu untersuchenden Geweben Glykogen enthalten ist.

12) PAS-Reaktion nach Hyaluronidase-Behandlung

Zur Prüfung, ob in den zu untersuchenden Substanzen hyaluronsäurehaltige Mucopolysaccharide enthalten sind, behandelten wir die Schnitte mit Hyaluronidase, um so durch enzymatische Hydrolyse die Mucopolysaccharide herauszulösen. Wenn nach Anwendung der Hyaluronidase-Behandlung die PAS-Reaktion nach wie vor gleich stark positiv ausfällt, dann sind andere Stoffe als Mucopolysaccharide für den Ausfall der Reaktion verantwortlich.

13) Prüfung der Eisenbindefähigkeit nach HALE

Diese Methode wird im allgemeinen zur Darstellung von sauren Mucopolysacchariden verwendet. Die mit kolloidalem, dialysierten Ferrihydroxyd vorbehandelten Schnitte werden, nachdem das kolloidale Eisen von sauren Gruppen (zum großen Teil von Schwefelsäureestern) gebunden werden mit der Berlinerblau-Reaktion nachbehandelt und sind dann blau gefärbt. Auch bestimmte Eiweiße und oxydierte ungesättigte Lipide können im geringen Maß kolloidales Ferrihydroxyd binden. Ganz allgemein ist die Methode zum Nachweis der "Eisenbindefähigkeit" von Strukturen verwendbar.

14) Der Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC

SH-Gruppen des Gewebes können Ferricyanid zu Ferrocyanid reduzieren. Das resultierende Ferrocyanid verbindet sich mit dreiwertigem Eisen zu einem unlöslichen Präzipitat von Berliner-Blau (PEARSE, 1960, 1972). Da jedoch auch eine Reihe anderer Stoffe wie z.B. Lipopigmentgranula Ferricyanid reduzieren vermögen, kann diese Methode nicht als spezifisch für SH-Gruppen

betrachtet werden. Mit diesem Test soll das Reduktionsvermögen der oxydierten höheren Fettsäuren nachgewiesen werden. Die reduzierenden Stoffe weisen eine tiefblaue Färbung auf.

15) Der Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC nach KCN-Behandlung

Zur Differenzierung von Disulfidgruppen wurde der Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC um einen zweiten Schritt ergänzt. Durch KCN werden vorhandene SS-Gruppen im Gewebe zu aktiven SH-Gruppen reduziert und anschließend mit dem Reduktionstest nachgewiesen.

16) Der Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC nach HgCl_2 -Behandlung

Da der Reduktionstest wie oben beschrieben unspezifisch ist, wird dieser Test nach HgCl_2 -Blockierung der SH-Gruppen als Kontrollreaktion durchgeführt. Sie kann dann als indirekter Nachweis der SH-Gruppen dienen. (Hg-Salzblockierung).

17) Ninhydrin-Schiff-Reaktion

Diese relativ einfache und spezifische Methode dient als allgemeine Proteinnachweisreaktion. Durch die Einwirkung von Ninhydrin auf die Gewebe werden alpha-Aminogruppen unter Bildung eines um ein C-Atom ärmeren Aldehydestes abgespalten, der darauf mit dem Schiff'schen-Reagenz nachgewiesen wird. Die Proteine sind rotviolett gefärbt.

Fermentnachweise:

18) Saure Phosphomonoesterase nach GOMORI (Metallsalzmethode)

Das Prinzip dieser Nachweisreaktion besteht darin, daß bei saurem pH durch das Gewebsenzym ein aus dem künstlichen Substrat (Na- β -Glycerophosphat) freigesetztes Phosphorsäureradikal primär mit einem in die Inkubationslösung verbrachten Metallion (Bleiion) reagiert, das dann sekundär mit Ammoniumsulfid in schwarzes Bleisulfid überführt wird.

19) Saure Phosphomonoesterase nach BARKA und ANDERSON (1963) (Azofarbstoffmethode)

Auch in dieser Nachweismethode kommt es zu enzymatischen

Hydrolyse und zur Kupplung des aus dem zugesetzten künstlichen Substrat (α -Naphthylphosphat) freiwerdenden Naphtols mit einem Diazoniumsalz zu einem unlöslichen roten bis rotbraunen Azofarbstoff.

20) Alkalische Phosphomonoesterase nach BARKA und ANDERSON
(1963)

Das Substrat Naphthol-AS-MX-Phosphat wird bei alkalischem pH durch das im Gewebe vorhandene Enzym gespalten. Das freiwerdende Naphtol reagiert mit dem im Inkubationsmedium enthaltenen stabilen Diazoniumsalz unter Bildung blauer unlöslicher Farbniederschläge (Fast-Blue-RR-Niederschläge).

21) Unspezifische Esterase nach PEARSE mod. n. BURSTONE

Die unspezifische Esterase, die vorwiegend kurzkettige Fettsäureester einfacher Alkohole und Phenole bevorzugt spaltet, hydrolysiert langsamer Fettsäuren und Glycerinester mit längeren Ketten. Bei neutralem pH hydrolysiert das im Gewebe enthaltene Enzym das künstliche Substrat (Naphthyl-AS-D-Acetat). Das freigewordene Naphthol reagiert mit dem im Inkubationsmedium vorhandenen stabilen Diazoniumsalz (Fast Garnet GBC) unter Bildung roter unlöslicher Präzipitate.

23) Lipase nach BARKA und ANDERSON (1963)

Die Lipase vermag relativ langkettige Fettsäureester zu spalten. Die im Verlauf der enzymatischen Hydrolyse in Freiheit gesetzten Fettsäuren bilden mit dem Calcium der Inkubationslösung eine unlösliche Calciumseife. Diese wird im Laufe der Nachweisreaktion zunächst in eine Bleiseife, später in braunschwarzes Bleisulfid überführt.

B. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Aufgrund der Tatsache, daß Lipopigmente eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz besitzen, wurden ungefärbte Kryostat- bzw. Paraffinschnitte fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Da diese Eigenfluoreszenz der Pigmentkörner in den meisten Präparaten histochemischer Reaktionen und Färbungen erhalten blieb, und nur leicht durch die jeweilige Behandlung der Schnitte in

ihrem Farbton modifiziert wurden, gelangten diese Präparate ebenfalls zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung. Als Fluoreszenzmikroskop diente ein Leitz-Forschungsmikroskop ORTHOPLAN mit Fluoreszenzquecksilberdampfhochdruckbrenner HB-200. Als Erregerfilter benutzten wir das BG12/3 mm sowie das BG12/5 mm und die Sperrfilter K510 und K530. Bei unserer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung gingen wir davon aus, daß das Lipopigment nicht gleichmäßig über das gesamte Lebergewebe verstreut war, sondern sich auf begrenzte Areale beschränkte. Dies veranlaßte uns bei unseren Auszählungen stichprobenartig vorzugehen, d.h. unsere Auszählungen beschränkten sich hauptsächlich auf die oben beschriebenen Areale. Als Beispiel für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparateserien einiger histochemischer Reaktionen und Färbungen sei die Untersuchung der PAS-Reaktionspräparate angeführt. In den Sternzellen kamen auch PAS-positive Substanzen vor, die nicht fluoreszierten. Wir legten daher als Kriterium bei der Untersuchung auf Lipopigmentgranula fest, daß die PAS-positiven Substanzen in den Sternzellen auch fluoreszieren müssen, um als Lipopigmentgranula identifiziert werden zu können.

Desweiteren kurz eine Erläuterung zum Untersuchungsgang der Berliner-Blaupräparateauswertung.

Wir untersuchten zunächst die Gewebe auf ihren Gehalt an fluoreszierenden Pigmentgranula, um anschließend im Lichtmikroskop eine evtl. Identität mit den Berliner-Blau-positiven Substanzen zu überprüfen.

C) Auswertung der Fermentnachweispräparate

Bei der Auswertung der "Sauren-Phosphatase"-Präparate gingen wir wie folgt vor:

Zunächst untersuchten wir die Präparate auf ihren Gehalt an fluoreszierenden Pigmentgranula.

Dann setzten wir die Größe der Pigmentgranula in das Verhältnis zu der Menge der Bleisulfidniederschläge die die Enzymaktivität in denselben Sternzellen markierten.

Bei der Untersuchung der übrigen Fermentnachweispräparate verfahren wir analog zur Auswertung der Saure-Phosphatasepräparate.

D) Statistische Auswertung

Die Auszählung der fluoreszierenden Pigmentgranula mit anschließender Erstellung einer Kurve diente ausschließlich dem Zweck der Charakterisierung der Lipopigmentgenese, nicht jedoch u.a. um eine verbindliche Gesetzmäßigkeit der Lipid- bzw. Pigmentclearance für bestimmte Zeiträume nach einmaliger Lipidinfusion an Wistarratten abzuleiten.

Unsere Versuchsergebnisse wurden statistisch wie folgt ausgewertet: (Literatur: siehe bei CAVALLI-SFORZA, 1972)

- 1) 10 Gesichtsfeldauszählungen pro Präparat
- 2) Numerische Berechnung des Mittelwertes
- 3) Standardabweichung der Einzelwerte vom Mittelwert

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x-m)^2}{n-1}}$$

(nach CAVALLI-SFORZA, 1972)

E. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das Gewebematerial aus dem Lobus sinister der Leber lebensfrisch entnommen, mit einigen Tropfen 2%iger, gepufferter OSO_4 -Lösung nach MILLONIG (1962) bedeckt, in 10 bis 15 Stücke mit einer Kantenlänge von 1 mm zurechtgeschnitten und durch Immersion in der gleichen Fixierungslösung 2 Stunden bei 4°C fixiert. Danach wurden die Gewebsstücke zweimal 15 Minuten bei 4°C in Pufferlösung nach MILLONIG (1962) gewaschen, anschließend in ansteigender Äthanolreihe dehydriert und über Propylenoxyd in Epon 812 (LUFT, 1961) eingebettet.

Das eingebettete Material wurde zur weiteren technischen Bearbeitung und Erhebung der elektronenmikroskopischen Befunde Herrn Prof. Totović zur Verfügung gestellt.

V. Makroskopische Befunde

Zirka 2 Minuten nach Injektion der Lipidemulsion beobachteten wir in der Regel kurzzeitig eine Hämaturie.

In den ersten 30 Minuten zeigte die Leber eine deutlich gelbweißliche Injizierung durch die Lipidemulsion, während zu allen anderen Zeitpunkten makroskopisch kein besonderer Befund erhoben werden konnte.

VI. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde (s. Tabelle II, III, IV)

A. Kontrollversuche

Die Befunde der Kontrollversuche und des Lecithinversuchs gleichen sich in allen wesentlichen Punkten so daß sie zusammen beschrieben werden.

Im Blickpunkt der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung sowie der histologischen Färbungen und histochemischen Reaktionen stand der Inhalt der Sternzellen.

Anhand der HE-Färbung konnte kein besonderer Befund erhoben werden. Auch die Untersuchung auf Eigenfluoreszenz erbrachte keine Besonderheiten. Mit der Ölrot-Färbung konnte eine meist geringgradige, periphere feintropfige Verfettung der Parenchymzellen nachgewiesen werden. In den Sternzellen sah man vereinzelt Sudanschwarz-positive sowie Diastase-labile und Hyaluronidase stabile PAS-positive Granula. Diese spärlichen Granula zeigten bei der HALE'schen Reaktion eine Eisenbindung und nach dem Reduktionstest (Chèvremont-Frédéric) eine blaue Anfärbung.

Beim Nachweis der sauren Phosphatase (GOMORI bzw. BARKA) zeigte sich eine gleichmäßige, feingranuläre Reaktion in den Parenchymzellen und in den Sternzellen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase war hauptsächlich in den Leukozyten nachzuweisen. Feinste und vereinzelt vorkommende Farbniederschläge waren auch im Parenchym, jedoch im allgemeinen nicht in den Sternzellen zu finden. Die Aktivität der unspezifischen Esterase fand sich in Form einer feingranulären Reaktion in den Sternzellen und in den Hepatozyten und zwar hauptsächlich in dem Läppchenzentrum. Eine Lipaseaktivität war vornehmlich in den Läppchenzentralen Leberzellen und in geringem Ausmaß in den Sternzellen vorhanden. Alle anderen histochemischen Reaktionen und Färbungen ergaben hinsichtlich des Inhaltes der Sternzellen keine besonderen Befunde.

B. Befunde der Hauptversuche (i.v. Injektion v. Lebertran-
emulsion)

Vor der Schilderung der Befunde ist zu erwähnen, daß die typische Eigenfluoreszenz der Lipopigmente bei den meisten Reaktionen und Färbungen erhalten blieb und zumeist nur durch die Färbungen und histochemischen Reaktionen im Farbton modifiziert wurde. Es war daher möglich, genauere Aussagen zu machen, ob die genannten Färbungen und histochemischen Reaktionen das ganze Granulum, periphere Anteile der Körnchen oder nur die umgebenden Cytoplasmaanteile darstellten.

Nach dem 1. Tag zeigte sich bei der Ölrot-Färbung eine massive vorwiegend mittel- bis großtropfige Verfettung der Leberzellen. Die Sternzellen, Kapillaren und Sinusoide enthielten in mäßigem Umfang feintropfige Fettsubstanzen. Bei der HE-Färbung und bei der Prüfung der Eigenfluoreszenz zeigten sich in den Sternzellen mitunter am Rande kleiner Vakuolen feine fluoreszierende Ringe, die keine Eigenfarbe aufwiesen und mit der Nilblausulfatfärbung blau, nach der ZIEHL-NEELSEN-Reaktion rosarot angefärbt sowie PAS-negativ waren. Die anderen Färbungen und histochemischen Reaktionen und die Fermentnachweise ergaben keine wesentlichen Abweichungen von denen der Kontrollversuche.

Nach 2 Tagen sah man bei der Ölrot-Färbung noch immer eine massive, großtropfige Verfettung der Leberzellen. Feine Lipidtropfen waren auch in den Sinusoiden und in geringem Umfang in den Sternzellen vorhanden. Fluoreszenzmikroskopisch zeigten sich in den Sternzellen sowohl in der HE-Färbung als auch in den ungefärbten Paraffinschnitten spärliche, undeutliche konturierte hellgrünlich fluoreszierende Ringe bzw. unregelmäßig (bizarr) geformte Partikel ohne Eigenfarbe. Sie waren bei der Sudanschwarz-Färbung (am eingebetteten Material) hellbraun, bei der Nilblau-Sulfat-Färbung tiefblau und bei der ZIEHL-NEELSEN-Reaktion schwach rosarot gefärbt. Man erkannte in ihnen mehr oder weniger deutlich lamellen- oder

fingerartige Strukturen. Die Luxol-Fast-Blue-Färbung stellte diese Partikel inkonstant hellbau dar. Nach der PAS-Reaktion waren sie überwiegend in der Peripherie kräftig rot gefärbt und zeigten im Zentrum eine schwach goldgelbe Fluoreszenz. Nach vorheriger Acetylierung fiel die PAS-Reaktion negativ und nach der anschließenden Verseifung wieder positiv aus. Nach einer Diastase - und Hyaluronidasevorbehandlung war die PAS-Reaktion nicht abgeschwächt. Bei der Eisenbindungs-Reaktion nach HALE stellten sich die Partikel schwach blau dar. Nach der Berliner-Blau-Reaktion kamen in einigen Sternzellen neben blaugefärbten, nicht fluoreszierenden Körnchen auch nicht blau gefärbte, gelbfluoreszierende Partikel vor. Weit- aus häufiger waren jedoch Sternzellen zu finden, die entweder nur Berliner-Blau-positive oder nur fluoreszierende Partikel enthielten. Der Reduktionstest nach CHÈVREMENT-FRÉDÉRIC fiel inkonstant aus: Einige der (jetzt) gelbgrünlich fluoreszieren- den Partikel waren blau gefärbt, andere ließen kein Redukti- onsvermögen erkennen und blieben ungefärbt. Mit der Ninhy- drin-Schiff-Reaktion zeigten die Partikel einen roten Saum. Bei den übrigen histochemischen Reaktionen konnte gegenüber dem vorhergehenden Zeitabschnitt keine Änderung festgestellt werden.

Bei dem Nachweis der sauren Phosphatase beobachtete man im Zytoplasma der Sternzellen in der Umgebung der fluoreszieren- den Partikel eine zunehmende Aktivität. Bei der unspezifi- schen Esterase und Lipase fand man um die fluoreszierenden Partikel oder in deren Einbuchtungen, im Vergleich zu den Kontrollversuchen nicht vermehrt vorkommend, eine feingranu- läre Reaktion.

Nach 3 Tagen ließ die Ölrot-Färbung einen Schwund der Leber- zellverfettung erkennen. Die Sternzellen enthielten licht- mikroskopisch kein Fett mehr. Die Menge und die Eigenfluores- zenzen der nun deutlich konturierten hellgelben Granula (am Vortage noch als Partikel bezeichnet) nahmen stetig zu. Die fluoreszierenden Granula wiesen lamelläre oder fingerartige

Strukturen oder Einbuchtungen auf.

Auch zu diesem Zeitpunkt wiesen die Granula keine Eigenfarbe auf. In den mit Sudanschwarz und Nilblau-Sulfat (am eingebetteten Material) gefärbten Schnitten stellten sich in den Sternzellen tiefbraune (sudanophile) bzw. tiefblaue, vollständig gefärbte Granula dar, die PAS-positiv waren und nach der ZIEHL-NEELSEN-Reaktion eine schwach rosarote Färbung aufwiesen. Der Reduktionstest nach CHEVREMONT-FRÉDÉRIC blieb weiter inkonstant, jedoch fand man nach vorhergehender KCN-Behandlung der Schnitte nunmehr ebenfalls inkonstant hellblau gefärbte Granula in den Sternzellen. Die übrigen histochemischen Reaktionen und Färbungen blieben im Vergleich zum Vortage konstant.

Bei den Fermentnachweisen ist hervorzuheben, daß in den Sternzellen die Aktivität der sauren Phosphatase in der Umgebung der fluoreszierenden Granula, weiterhin stetig zugenommen hatte. Im Vergleich zum Vortage zeigten sich keine quantitativen und qualitativen Veränderungen der übrigen Enzymreaktionen.

Nach 4 Tagen ließ die Untersuchung der Eigenfluoreszenz in den Sternzellen eine größere Menge hellgelblich fluoreszierende Granula erkennen. Sie wiesen keine Eigenfarbe auf und stellten sich bei der PFAS-Reaktion schwach rot dar, jedoch nicht nach vorheriger Bromierung der Schnitte. Bei der ZIEHL-NEELSEN-Reaktion waren diese Granula tiefrot gefärbt und hatten nach dieser Reaktion ihre Fluoreszenz verloren. Bei der PAS-Reaktion stellten sich die Granula kräftig rot dar, auch nach vorheriger Diastase- bzw. Hyaluronidasebehandlung der Schnitte. Nach der Berliner-Blau-Reaktion sah man zu diesem Zeitpunkt eine besonders hohe Zahl von Sternzellen, die blaue, nicht fluoreszierende Partikel enthielten. Die Zahl der Sternzellen, die neben diesen blauen, nicht fluoreszierenden Substanzen auch gelblich fluoreszierende eisenfreie Granula enthielten, blieb unverändert klein. Bei dem Reduktionstest nach

CHEVREMONT-FRÉDÉRIC waren die fluoreszierenden Granula weiterhin inkonstant hellblau gefärbt. Nach vorheriger KCN-Behandlung war der Reduktionstest nunmehr deutlich positiv. Die anderen histochemischen Reaktionen und Färbungen ließen keine Veränderungen gegenüber dem vorhergehenden Zeitabschnitt erkennen.

Die Aktivität der sauren Phosphatase in den Sternzellen hatte weiterhin zugenommen. Die anderen Enzymreaktionen zeigten keine Abweichungen zum Vortage.

Nach 5 Tagen erreichte die Menge der nun zitronengelb fluoreszierenden Granula in den Sternzellen ein Maximum. Die Pigmentgranula zeigten nunmehr eine ganz schwach hellgelbe Eigenfarbe. Sie waren nach der PFAS-Reaktion deutlich rot gefärbt. Bei der Berliner-Blau-Reaktion konnte eine Abnahme der blau-gefärbten und nicht fluoreszierenden Substanzen in den Sternzellen nachgewiesen werden. Bei der nach wie vor positiven PAS-Reaktion und ihren Kontrollen war keine Abweichung zum vorhergehenden Zeitabschnitt festzustellen. Bei den übrigen histochemischen Reaktionen und Färbungen ergab sich gegenüber dem Vortage keine Änderung.

Die Aktivität der sauren Phosphatase in den Sternzellen erreichte zu diesem Zeitpunkt ein Maximum, während die Lipase-aktivität sich nicht mehr wesentlich von den Kontrollversuchen unterschied.

Bei der unspezifischen Esterase fand man um die Pigmentgranula oder in deren Einbuchtungen eine fein- vereinzelt nun grobgranuläre Reaktion. Bei der alkalischen Phosphatase zeigten sich weiterhin keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen.

Nach 6 Tagen nahm in den ungefärbten Schnitten die Zahl der zitronengelb-fluoreszierenden Granula in den Sternzellen ab. Die Eigenfarbe der Granula war weiterhin ganz schwach hellgelb. Nach der PAS-Reaktion waren die Pigmentgranula weiterhin kräftig rot gefärbt.

Die übrigen histochemischen Reaktionen und Färbungen unterschieden sich nicht von denen des Vortages.

Die Aktivität der sauren Phosphatase in den Sternzellen hatte abgenommen. Bei den anderen Fermentnachweisen waren im Vergleich zum Vortage keine wesentlichen Änderungen festzustellen.

Nach 1. bis 12. Wochen: Die Eigenfarbe der Pigmentgranula war nach der 2. Woche hellgelblich, nach der 5. Woche ganz schwach hellbräunlich und in der 12. Woche hellbräunlich. Die bis zur 3. Woche gelbbräunliche Eigenfluoreszenz der Granula in den Sternzellen ging von der 4. bis zur 12. Woche in goldbraun über. Von der 3. bis 6. Woche nahm die Zahl der Pigmentgranula stetig ab. Dabei zeigte sich ein Abtransport der Pigmentgranula in Richtung auf die Portalfelder, während die Sternzellen der intermediären und zentralen Läppchenanteile nur noch wenige Pigmentgranula enthielten.

Bei der PAS-Reaktion waren die Granula von der 1. bis zur 12. Woche rot gefärbt.

Die übrigen histochemischen Reaktionen und Färbungen blieben während der 12 Wochen im Vergleich zum 6. Tage konstant.

Fermenthistochemisch zeigten sich keine Veränderungen gegenüber den Kontrollen.

Übersicht über die fluoreszenzmikroskopischen, histochemischen und färbereischen Eigenschaften des entstehenden Pigmentes in den Sternzellen

Reaktionen	unfix. Kryoschnitt	Paraffinschnitt	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	1. Woche	2. Woche - 12. Woche
Eigenfarbe	X	X	farblos	farblos	farblos	farblos	g. schwach gelb	hellgelb	zitronengelb	hellgelb-schwach hellbräunlich
Eigenfluoreszenz	X	X	hellgrünlich	hellgrünlich	hellgelb	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb	gelb-bräunlich goldbraun (4.-12. W.)
Blaulicht			(+)	(++)	++	++	+++	++	++	+
Färbung mit Ölrot	X		++	+	o	o	o	o	o	o
Nilblausulfatfärbung		X	(+)	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Färbung mit Sudanschwarz		X	o	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Perameisensäure-Schiff-Reaktion		X	o	o	o	+	++	++	++	++
Perameisensäure-Schiff-Reaktion nach Bromierung		X	o	o	o	o	o	o	o	o
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN		X	(+)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Färbung mit Luxol-Past-Blue		X	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
PAS-Reaktion		X	o	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PAS-Reaktion nach Acetyl-tylierung		X	o	o	o	o	o	o	o	o
PAS-Reaktion nach Acetyl-tylierung u. Verseifung		X	o	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PAS-Reaktion nach Diastase		X	o	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PAS-Reaktion nach Hyaluronidase		X	o	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Eisenbindung nach HALE		X	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Berliner-Blau-Reaktion		X	o	o	o	o	o	o	o	o
Reduktionstest nach CHEVREMENT-FRÉDÉRIC		X	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Reduktionstest nach KCN		X	o	o	(+)	+	+	+	+	+
Reduktionstest nach HgCl ₂		X	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
N-nhydriin-Schiff-Reaktion		X	o	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle III (Fortsetzung)

Fermentnachweise:	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	1. Woche	2.-12. Woche
saure Phosphatase nach GOMORI/BARKA u. ANDERSON (am fix. Gefrier- schnitt)	+	+	++	++	+++	+	+	+
alkalische Phos- phatase (am unfixierten Kryostatschnitt)	o	o	o	o	o	o	o	o
unspezifische Esterase nach PEARSE mod. u. BURSTONE (am fix. Gefrier- schnitt)	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase nach BARKA u. ANDERSON (am fix. Gefrier- schnitt)	(+)	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)

Anmerkungen zur Tabelle III

Quantität der fluoreszierenden Pigmentgranula (Eigenfluoreszenz):

+++ = sehr große Menge, ++ = große Menge, + = mittelgroße Menge,

(+) = schwach, fluoreszierende Ringe in den Sternzellen.

Zu den histochemischen Reaktionen und Färbungen:

Reaktion: +++ = sehr stark, ++ = stark, + = deutlich positiv,
(+) = inkonstant oder schwach positiv, o = negativ.

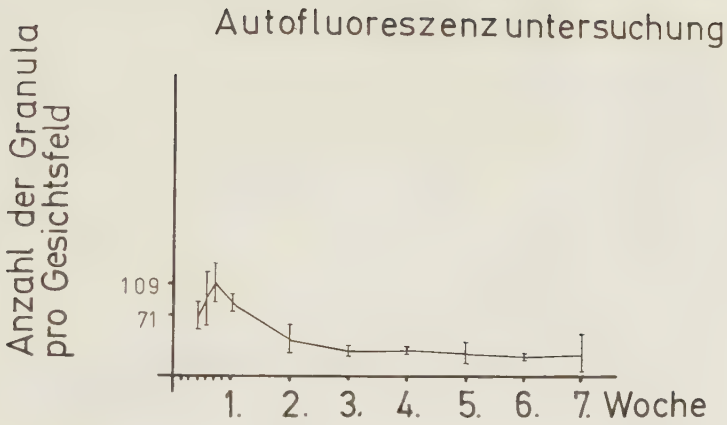


Abb. 1

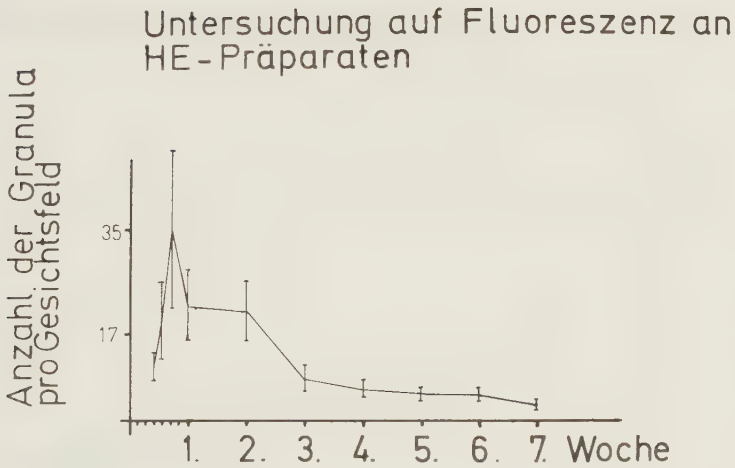


Abb. 2

Untersuchung auf Fluoreszenz von 11 histochemischen Präparate- serien

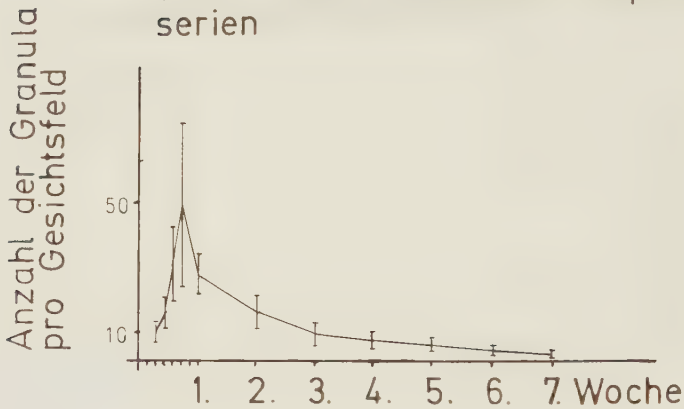


Abb. 3

Fluoreszenzuntersuchung an Luxol- Fast-Blue-Präparaten

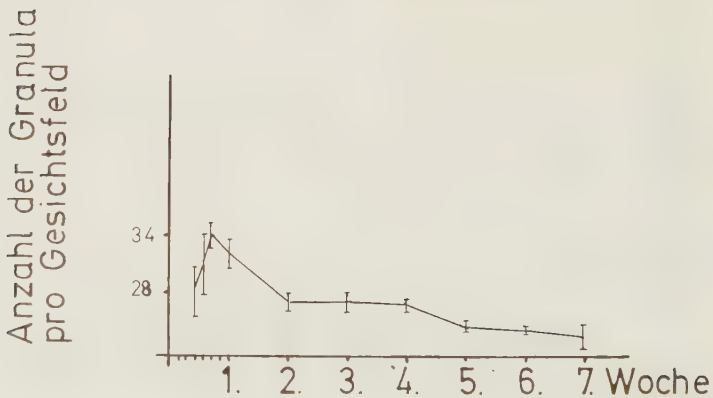


Abb. 4

Änderung der fluoreszenzmikroskopischen
und histochemischen Eigenschaften des
entstehenden Lipopigmentes

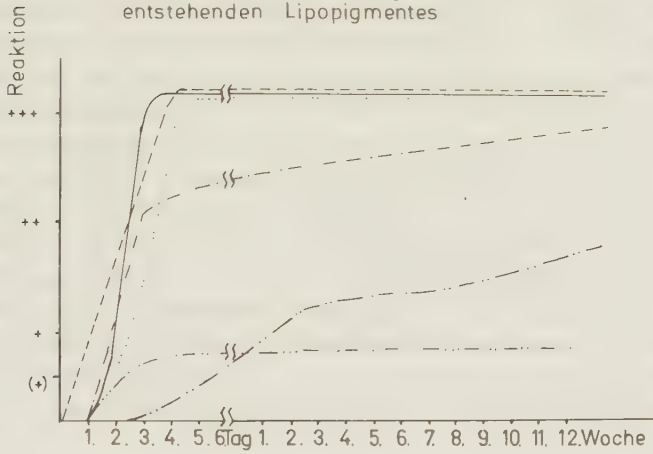


Abb. 5

Anmerkung zum Diagramm:

- ...-.- Eigenfarbe
- ...-... Reduktionsvermögen (CHEVREMONT-FRÉDÉRIC)
- Säurefestigkeit (ZIEHL-NEESEN)
- .-.-.- Autofluoreszenz
- _____ Sudanophilie (am eingebetteten Material)
- PAS-Reaktion

C. Befunde der Nebenversuche

(i.v. Injektion einer Suspension von Erythrozytenstroma):

In den ungefärbten Präparaten zeigte sich in den Sternzellen ein zumeist fein granuläres, farbloses bis schwach hellgelbes, zitronengelb fluoreszierendes Material. Bei der Sudanschwarzfärbung (am eingebetteten Material) traten in den Sternzellen nicht fluoreszierende Granula auf, die nach der Nilblau-Sulfat-Färbung eine tiefblaue und nach der PFAS-Reaktion bzw. nach der Ziehl-Neelsen-Reaktion eine rote Färbung aufwiesen. Diese Granula waren PAS-positiv auch nach Diastase-Vorbehandlung. Bei dem Reduktionstest (nach Chèvremont-Frédéric) mit und ohne KCN-Vorbehandlung fand man feinste, nicht fluoreszierende, blaugefärbte granuläre Substanzen in den Sternzellen. Die übrigen histochemischen Reaktionen und Färbungen ergaben keine von den Kontrollversuchen abweichende Ergebnisse. Im Vergleich zu den Kontrollen waren bei den Fermentnachweisen keine Abweichungen zu beobachten.

Tabelle IV

Übersicht über die Ergebnisse der Nebenversuche

Eigenfluoreszenz	+
Ölrot (am fix. Gefrierschnitt)	o
Färbung mit Sudanschwarz (am Paraffinschnitt)	+
Nilblausulfatfärbung	+
Perameisensäure-Schitt-(PFAS)-Reaktion	+
Säurefestigkeit nach ZIEHL-NEELSEN	+
PAS-Reaktion	+
PAS-Reaktion nach Diastase	+
Berliner-Blau-Reaktion	o
Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC	+
Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC nach KCN-Be- handlung	+
Ninhydrin-Schiff-Reaktion	o

Fermentnachweise:

saure Phosphatase nach GOMORI/BARKA und ANDERSON	+
alkalische Phosphatase	o
unspezifische Esterase nach PEARSE mod.n. BURSTONE	+
Lipase nach BARKA und ANDERSON	±

Reaktion: + = positiv, o = negativ, ± = schwach bis
inkonstant

VII. Elektronenmikroskopische Befunde

(5 Minuten - 12. Woche)

Die elektronenmikroskopischen Befunde wurden von Dr. Kajihara, Prof. Dr. Totovic und Prof. Dr. Gedigk erhoben, und zwar teils an dem von mir zur Verfügung gestellten Gewebsmaterial, überwiegend an unabhängigen, parallel zu meinen Versuchen durchgeführten Experimenten von Herrn Dr. Kajihara.

Nach 5 Minuten fand man in den Sinusoidlichtungen zahlreiche freiliegende Fettröpfchen mit einem Durchmesser von 1 - 8 μ , die zum Teil an der Oberfläche der Zellmembran der Sternzellen hafteten. An diesen Stellen konnte man häufig eine Ausbildung von Pseudopodien und unterschiedlich tiefen Invaginationen der Zellmembran beobachten. Im Cytoplasma der Sternzellen sah man zahlreiche von einer einfachen Membran begrenzte Vakuolen, die einzelne oder mehrere Fettröpfchen enthielten. Innerhalb dieser Endocytose-Vakuolen (Phagosomen) waren häufig Anzeichen einer Konfluenz einzelner Fettröpfchen zu einem größeren Tropfen zu finden.

In der Umgebung von Phagosomen waren präexistente "dense bodies" zu sehen, die mitunter in enger Beziehung zu den Phagosomen standen und stellenweise Fusionserscheinungen erkennen ließen. Die Phagosomen, bei denen eine Fusion mit präexistenten dense bodies erfolgte, zeigten an der Peripherie des eingeschlossenen Fettropfens einen halbmondförmigen, manchmal sogar ringförmigen elektronendichten, meistens amorphen Saum. Dieser Saum befand sich innerhalb der Grenzmembran des Phagosoms. Desweiteren fanden sich nicht selten auffallend große Golgi-Komplexe mit vielen Golgi-Vesikeln, die ebenfalls enge Beziehungen zu den Lipophagosomen zeigten. Das Cytoplasma mancher Sternzellen war nahezu vollständig von zahlreichen fetthaltigen Phagosomen (Lipophagosomen) ausgefüllt.

Nach 15 Minuten konnte es sichergestellt werden, daß die Phagozytose der Lipidtröpfchen in den Sternzellen noch stärker als nach 5 Minuten ausgeprägt war.

Ferner war es in den Phagosomen, die mehrere Fettröpfchen enthielten, zu einer Konfluenz einzelner Tröpfchen zu einem einzigen großen unregelmäßig gestalteten Tropfen gekommen. Auch eine Fusion der Lipophagosomen mit präexistenten Lysosomen (dense bodies) und Golgi-Vesikel war eindeutig nachweisbar. Auf diese Art und Weise dürfte eine Umwandlung von Phagosomen in sekundäre Lysosomen (Phagolysosomen) angenommen werden. Morphologisch kam dieser Vorgang vor allem dadurch zum Ausdruck, daß sich an der Peripherie der in den Phagosomen vorkommenden Fettröpfchen halbmondförmige oder ringförmige elektronendichte Säume bildeten. Im Bereich des Golgi-Apparates waren zahlreiche helle und dunkle Vesikel ebenfalls feststellbar.

Nach 30 Minuten waren in den Sinusoidlichtungen noch immer zahlreiche Fettropfen, wenngleich etwas weniger als nach 15 Minuten, sichtbar. Desweiteren fand man nach wie vor eine Adhärenz der Fettropfen an der Zellmembran und Zeichen einer Phagozytose. Häufig ließ sich an der Peripherie der in den Phagosomen eingeschlossenen Fettropfen die Bildung einer hellen Zone beobachten, was auf den beginnenden Abbau des phagozytierten Fettes hinweist. Weiter peripher, jedoch innerhalb der Phagosomengrenzmembran, war, wie bereits erwähnt, ein unterschiedlich breiter, meistens ringförmiger elektronendichter Saum erkennbar. Die Golgi-Komplexe waren nach wie vor stark ausgebildet und wiesen zahlreiche Vesikel mit einem elektronendurchlässigen oder elektronendichten Inhalt auf. Ein Teil dieser Vesikel zeigte eindeutige Fusionserscheinungen mit den Lipophagosomen.

Nach 1 Stunde beobachtet man nach wie vor zahlreiche freiliegende Fettröpfchen in den Sinusoidlichtungen, die an die Oberfläche der Sternzellen adhärten. Neben lipid-enthaltenden Phagosomen fielen nach wie vor große Golgi-Komplexe mit vielen Golgi-Vesikeln auf. Die Golgi-Vesikel standen in enger Beziehung zu den Phagosomen und zogen manchmal "stromartig" zu

den letzteren. An der Peripherie der in den Phagosomen eingeschlossenen Fettröpfchen war die bereits nach 30 Minuten beschriebene helle Zone des Öfteren zu sehen. Außerdem ließen sich im Bereich der Lipidtropfen auch vakuolenartige Aufhellungen feststellen. Die halbmond- bzw. ringförmige schmale elektronendichte Zone an der Peripherie der Phagolysosomen war häufig noch deutlicher als nach 30 Minuten zu sehen.

Nach 6 und 12 Stunden waren in den Sinusoidlichtungen noch sehr vereinzelt Fettröpfchen zu erkennen.

Die Umbauvorgänge an den Lipophagosomen waren weiter fortgeschritten. Die eingeschlossenen Fettropfen waren im allgemeinen verkleinert. Anstelle der zu früheren Zeitpunkten feststellbaren hellen peripheren Zone trat nunmehr eine Verdichtung der Fettröpfchen ein und schritt in Richtung auf das Zentrum zu. In den Lipophagosomen mit derartigen Umbauvorgängen nahmen die zentralen Abschnitte der eingeschlossenen Fettropfen eine unregelmäßige Form an. In kleineren Lipophagosomen mit den darin liegenden kleineren Fettropfen, war das Lipid z.T. bereits vollkommen zu einer körnigen bis amorphen Masse umgewandelt, in der man lamelläre membranartige Strukturen (Myelinfiguren) beobachten konnte. Neben einem prominenten Golgi-Apparat war nun auch eine Vermehrung des rauen endoplasmatischen Retikulums und insbesondere der freien Polysomen nachweisbar.

Nach 24 Stunden waren in den Sinusoidlichtungen nur sehr selten kleinere Fettröpfchen vorhanden. Der weiter fortgeschrittene Umbau der Phagosomen in den meisten Sternzellen war u.a. daran erkennbar, daß diese manchmal ganz bizarre unregelmäßige Formen annahmen und eine eindeutige Verdichtung des eingeschlossenen Materials aufwiesen. Solche umgebaute und verdichtete Lipophagosomen wurden als Propigmentgranula bezeichnet. Sie enthielten, wie vorher berichtet, häufig Myelinfiguren. Die Befunde hinsichtlich des Golgi-Komplexes und des rauen endoplasmatischen Retikulums gleichen denen des vorangegangenen Zeitabschnittes.

Nach 2 Tagen gelang es nur noch selten, entsprechend der weiter fortgeschrittenen Umstrukturierung der Lipophagosomen, im Zentrum derselben Reste der ursprünglichen Fettropfen nachzuweisen. Die ursprünglich rundlichen Phagosomen nahmen inzwischen ganz unregelmäßige, manchmal sogar bizarre, Formen an. Vereinzelt waren auch in manchen von ihnen Ferritinpartikelähnliche Strukturen erkennbar.

Nach 4, 5 und 6 Tagen wiesen die Propigment- und Pigmentgranula neben einer weiteren Verdichtung und Umstrukturierung eine Tendenz zur Verkleinerung auf.

Nach 1 Woche waren die meisten Propigmentgranula bereits in Pigmentgranula mit einem stark osmiophilen elektronendichten amorphen oder feinkörnigen Inhalt umgewandelt. An ihrer Peripherie war nach wie vor eine einfache Grenzmembran erkennbar. In manchen von ihnen waren wie zuvor Myelinfiguren bzw. deren Bruchstücke zu beobachten. Die Befunde hinsichtlich des Golgi-Apparates und des rauhen endoplasmatischen Retikulums zeigten keine Abweichungen von den vorhergehenden Zeitabschnitten.

Nach 2 und 3 Wochen schritt weiterhin die Verdichtung der Pigmentgranula fort. Diese Verdichtung, die mit einer Verkleinerung der Pigmentgranula verbunden war, war meistens begleitet von deren unregelmäßiger Außenform und der Tatsache, daß in ihnen auch unregelmäßig geformte osmiophile, amorphe Einschlüsse enthalten waren. Eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums und der Polysomen war nicht mehr nachweisbar. Auch der Golgi-Apparat war nun weniger ausgeprägt.

Nach 4 und 5 Wochen zeigten sich bis auf eine Verkleinerung und zunehmende Abrundung sowie eine Verdichtung der Lipopigmentgranula keine wesentlichen Abweichungen zu den Befunden der 2. und 3. Woche.

Nach 6 bis 12 Wochen hatten sich die meisten Pigmentgranula in relativ homogene, rundliche, sehr elektronendichte dense bodies umgewandelt, die manchmal nur schwer von denjenigen dense bodies zu unterscheiden waren, die man auch in den Kontrollversuchen, wenngleich in wesentlich kleinerer Anzahl, in den Sternzellen vorfand.

VIII. Diskussion

A. Welche Eigenfarbe (a), histochemischen, färberischen (b) und fluoreszenzmikroskopischen (c) Eigenschaften weist das entstehende Pigment während seiner Alterung auf?

a) Während der Umwandlung der Lipoidtropfen zu einem Lipopigment nehmen sie eine Eigenfarbe an. Nach 5 Tagen erkannte man eine angedeutete gelbliche Tönung. Nach 2 Wochen waren die Pigmentgranula bereits deutlich hellgelb, nach 4 Wochen schwach hellbräunlich und nach 12 Wochen deutlich hellbraun gefärbt.

b) Synchron mit der Entwicklung einer Eigenfarbe nimmt die Löslichkeit der gespeicherten Lipidtropfen ab. Schon am ersten Tage zeigte sich, daß die Randzone der Fettropfen trotz der zur Einbettung notwendigen Alkohol- und Xylolvorbehandlung nicht mehr wie die zentralen Anteile herausgelöst worden waren. In den Paraffinschnitten zeigte sich am Rande der nunmehr fettfreien Vacuolen ein schalenartiges, sudanophiles, säurefestes und mit Nilbau blau gefärbtes Material. Vom 2. Tag bis zur 12. Woche zeigten die Pigmentgranula eine deutliche Sudanophilie und eine Blaufärbung mit Nilblau. Die Luxolfastblaufärbung ergab vom 2. Tag bis zur 12. Woche eine schwache bis inkonstante Anfärbung, während die Eisenbindung nach Hale in dieser Zeit schwach positiv ausfiel. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion und der Reduktionstest nach Chèvremont-Frédéric waren vom 4. bzw. 2. Tag bis zur 12. Woche positiv bzw. schwach positiv, desgleichen die Säurefestigkeit mit der Ziehl-Neelsen Reaktion. Auch mit Ninhydrin-Schiff ergab sich am 2. Tag bis zur 12. Woche ein mehr oder minder geringer Reaktionsausfall. Die PAS-Reaktion fiel vom 2. Tag bis zur 12. Woche positiv aus, wobei zunächst nur die Randschichten der Granula, nach der ersten Woche jedoch auch ihre zentralen Anteile, rot gefärbt waren. Die Berliner-Blau-Reaktion fiel

an dem Ceroidkörnchen negativ aus. Allerdings war vom 2. bis zum 4. Tag ein zunehmender Gehalt an Eisenpigment in den Sternzellen nachweisbar, der vom 5. Tag bis zum Versuchsende stetig abnahm. Mitunter traf man in der gleichen Sternzelle fluoreszierendes Ceroidpigment und nicht fluoreszierende Eisenpigmentkörnchen nebeneinander.

Überblickt man die in der Tabelle III zusammengefaßten Befunde, so zeigt es sich, daß das nach einer Injektion von Lebertran in den Sternzellen entstehende Pigment in seinem färbereichen und histochemischen Verhalten mit Ceroidpigment übereinstimmt (SCHMIDT, 1953, GEDIGK und FISCHER, 1958, GEDIGK und PIOCH, 1965, WILHELM, 1968, HARTROFT und PORTA, 1965).

Bei den Untersuchungen der hydrolytischen Enzyme ergab sich lichtmikroskopisch am dritten Tag eine beginnende Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase am Rande der Fettvacuolen. Sie nahm in den folgenden Tagen zu und erreichte am 5. Tag ein Maximum. Vom 6. Tag an fiel die saure Phosphatase wieder ab und war vom 7. Tag bis zur 12. Woche nur noch in geringer Menge nachweisbar.

Beim Nachweis der unspezifischen Esterase bzw. Lipase fand man vom 1. Tag an in der Umgebung, aber auch in Einbuchtungen der fluoreszierenden Pigmentpartikel, eine geringe bzw. sehr geringe feingranuläre Reaktion, die auch in den folgenden Tagen und Wochen nicht weiter zunahm. Ein Maximum wie bei der sauren Phosphatase war nicht zu beobachten.

c) Es ist bekannt, daß das Ceroid eine gelblichgrüne bis goldbraune Autofluoreszenzfarbe aufweist. Um die Pigmentgenese anhand des Fluoreszenzvermögens der Pigmentgranula verfolgen bzw. charakterisieren zu können, bedurfte es zweierlei Untersuchungen, nämlich 1. einer Auszählung der fluoreszierenden Granula und 2. einer Beurteilung ihrer Fluoreszenzfarbe.

Am ersten Tag zeigten mitunter sich in den Sternzellen am Rand kleiner Fettvakuolen feine hellgelblichgrünlich fluoreszierende Ringe. Am 2. Tag waren tröpfchenartige Gebilde mit schalenartiger hellgelblicher Fluoreszenz und unregelmäßig gestaltete gelbliche Partikel zu erkennen. Am 3. Tag hatten Menge und hellgelbe Fluoreszenz der nun deutlich konturierten Granula zugenommen und erreichten am 5. Tag ein Maximum. Danach verringerte sich die Pigmentmenge kontinuierlich im Verlauf der 1. bis 12. Woche. Dabei änderte sich die Eigenfluoreszenzfarbe von der 1.-3. Woche nach zitronengelb und von der 4.-12. Woche nach goldgelb bzw. goldbraun.

Bei der quantitativen Auswertung war davon auszugehen, daß die Lipidaufnahme durch die Sternzellen vom akuten Funktionszustand der Leberstrombahn abhängig ist, die erheblichen physiologischen Schwankungen unterworfen ist und zudem durch den Eingriff, die Narkose und die Applikationsart modifiziert sein mag.

Wie zu erwarten, waren die Lipoidablagerungen nicht gleichmäßig über das Lebergewebe verteilt, sondern traten in unterschiedlichen Arealen gehäuft auf. Die Auszählungen mußten deshalb stichprobenartig vorgenommen werden, d.h. sie beschränkten sich auf die Gebiete mit maximalen Pigmentansammlungen. Aus diesem Grunde waren hohe Standardabweichungen zu erwarten.

Bei der Auswertung ergab sich folgendes Verteilungsmuster: (siehe Abbildungen 1-4)

Vom 1.-5. Tag stieg die Pigmentmenge relativ schnell an und erreichte am 5. Tag ein Maximum. Danach fiel die Kurve bis zur 2. Woche bis ungefähr zur Hälfte des Maximalwertes ab und danach stetig bis zur 7. Woche ab. Entsprechend der stichprobenartigen Auswahl der ausgezählten Bezirke ergaben sich große Standardabweichungen (s.d.w.u.).

Auch wenn die Kurve aufgrund der hohen Standardabweichungen statistisch nicht als signifikant angesehen werden kann, zeigt sich doch, daß am 5.Tag die gesamte durch die Sternzellen phagozytierte Lipidmenge zu Pigment umgewandelt wurde. Diese Pigmentmenge fällt - wie der abfallende Kurvenverlauf zeigt - dem Abtransport bzw. Abbau anheim.

Die hohen Abweichungen vom Mittelwert können aber noch durch einen anderen Umstand mitbedingt sein. Wie bereits erwähnt, kamen pro Zeitabschnitt im Durchschnitt 3 - 4 Tiere zur Untersuchung, deren Alter und Gewicht unterschiedlich war. Durch die Untersuchungen von LEMPERLE und REICHEL (1973) hat es sich gezeigt, daß die Clearance einer Lipidemulsion Beziehungen zum Körpergewicht aufweist. Da bei unseren Versuchen schwere Tiere im Vergleich zu leichteren eine höhere Pigmentclearance aufwiesen, ist daher anzunehmen, daß die Pigmentclearance vom Alter des Versuchstieres bzw. dem Körpergewicht abhängig ist. Es sei aber betont, daß eine Auszählung der fluoreszierenden Pigmentgranula mit anschließender Erstellung einer Kurve nicht dazu diente, um eine verbindliche Gesetzmäßigkeit der Lipid- bzw. Pigmentclearance nach einmaliger Lipidinfusion an Wistarratten abzuleiten.

Da die Lipopigmentgranula ihre Fluoreszenz auch nach vorheriger Färbung mit Hämatoxin-Eosin, Luxol-Fast-Blue sowie nach Durchführung der PAS-Reaktion (und ihrer Kontrollen) bzw. nach der HALE- und CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC-Reaktion (und ihrer Kontrollen) sowie nach der Ninhydrin-Schiff-Reaktion beibehielten, konnten auch diese 11 Präparateserien ausgewertet werden. Dabei ergab sich im Prinzip ein gleichartiges Verhalten der Kurve, wenngleich mit größeren Standardabweichungen (um den 5. Tag). Sie sind offenbar dadurch bedingt, daß Erythrozyten z.B. nach HE-Färbung und der PAS-Reaktion eine Sekundärfluoreszenz aufwiesen, die sich nicht immer eindeutig von der Primärfluoreszenz des

Lipopigmentes unterscheiden ließ. Bei der Luxol-Fast-Blue-Färbung, bei der die Erythrozyten eindeutig abzugrenzen waren, ergaben sich nur geringe Standardabweichungen.

Von der 3. bis zur 6. Woche konnte ein Abtransport der Pigmentgranula in Richtung auf die Portalfelder beobachtet werden, während die Sternzellen der intermediären und zentralen Läppchenanteile nur wenige Pigmentgranula enthielten. Demzufolge nahm ihre Anzahl ab.

Hinsichtlich der Wanderung des Lipopigmentes finden wir bei NEGLIA et al. (1963), WILHELM (1968), HARTROFT und PORTA (1969) ähnliche Beobachtungen, d h. das Pigment wird in den Sternzellen in Richtung auf die portalen Felder transportiert. Das Pigment soll nach NEGLIA et al. (1963) und HARTROFT und PORTA (1965) bis zu den Lymphknoten transportiert werden. Jedoch konnten wir nicht (wie HARTROFT und PORTA, 1965) beobachten, daß das Pigment während seines Abtransportes von Zelle zu Zelle weitergegeben wird.

B. Wie erklären sich die färberischen, histochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften des in den Sternzellen gespeicherten Lipids bei der Umwandlung zu einem Lipopigment?

Aus der Literatur ist seit langem bekannt (GEDIGK und FISCHER, 1958, 1959; THOMPSON, 1969), daß Lipopigmente vom Ceroidtyp experimentell durch die Injektion von Fetten, Fettemulsionen, Ölen und Fettsäuremethylestern hervorgerufen werden können. Allerdings ist nicht jedes Fett geeignet, eine Pigmentbildung zu induzieren. Beschrieben sind Ceroidbildungen nach Injektion von Wollsaamen-, Weizen-, Lein-, Erdnuß-, Sojabohnen- und Olivenöl sowie nach Lebertran (zusammenfassende Literatur s. THOMPSON, 1969). Aus diesen Untersuchungen hat es sich gezeigt, daß die Anwesenheit zahlreicher Doppelbindungen in ungesättigten Fetten bzw. Fettsäuren für die Bildung des Ceroidpigmentes notwendig ist (HASS, 1938, ENDICOTT, 1944, GEDIGK und PIOCH, 1965, HARMS, 1965, DEBUCH et al., 1965), da an den Doppelbindungen leicht Peroxyde entstehen können (s.w.u.). Die gebildete Pigmentmenge ist dabei proportional der Zahl der Doppelbindungen. Wurden die in den Fettsäuren vorliegenden Doppelbindungen zuerst mit Brom oder Wasserstoff abgesättigt (HASS, 1938) oder dem Lebertran Antioxydantien zugesetzt (GEDIGK und PIOCH, 1965), dann erfolgte die Pigmentbildung verzögert oder nicht mehr.

Auch durch eine Autooxydation von Fetten in vitro gelang es, ein ceroidartiges Pigment zu erzeugen (HASS, 1938; ENDICOTT, 1944; FARMER, 1943, zit. GEDIGK, PIOCH; ROSS et al., zit. GEDIGK, PIOCH; ELLIS, 1950, zit. GEDIGK, FISCHER; CASSELMAN, 1951; GEDIGK, FISCHER, 1959; GEDIGK u. PIOCH, 1965; WOLMAN u. SOSHAN, 1960; PORTA, 1963). Wiederum zeigte sich die Abhängigkeit der Autooxydation von der Anwesenheit ungesättigter Fette d.h. die Erhöhung der Autooxydationsrate stieg mit der Zahl der Doppelbindungen (SEDLACEK, 1958). Allerdings war sie auch abhängig von der aktiven Oberfläche der

Fettpartikel (Emulsion) und der Temperatur (CASSELMAN, 1951).

Das durch Lipoidinjektionen in vivo entstandene Ceroid und die in vitro gebildeten ceroidartigen Pigmente zeichneten sich durch eine Sudanophilie, Basophilie, Säurefestigkeit, eine positive PAS-Reaktion und durch ein Fluoreszenzvermögen aus.

Über die Autooxydation ungesättigter Fettsäuren liegt in der chemischen Literatur seit Jahrzehnten ein fast unüberschaubares Material vor (HARMS, 1965). Vor allem aus der Nahrungsmittelchemie ist die Autooxydation beim Ranzigwerden der Fette seit langem bekannt. Zu ihrer Charakterisierung wurden dabei der Anstieg der Peroxydzahl, der Säurezahl, der Aldehyde, der Viskosität und die Verschiebung der UV-Emission verwendet. Nach SEDLACEK (1958, 1966) werden bei der Autooxydation primär Hydroperoxyde und Peroxyde, sekundär Aldehyde sowie Spaltprodukte mit freien Carboñylgruppen und Ketosäuren gebildet. Besonders bei der thermisch potenzierten Autooxydation wird die Bildung dieser Oxydationsprodukte von einer Polymerisation begleitet (SEDLACEK, 1958, 1966, 1969), wobei zunächst konjugierte Hydroperoxyde, danach Dimere und Trimere und schließlich Polymere mit peroxydierten Brücken (polymere Peroxyde) sowie reaktiven Hydroperoxydgruppen entstehen. Polyungesättigte Fettsäuren sind besonders polymerisationsfreudig.

In der medizinischen Literatur besteht seit HASS (1938) weitgehende Übereinstimmung, daß bei der Bildung ceroidartiger Pigmente eine Autooxydation von ungesättigten Fetten mit Polymerisation der Oxydationsprodukte zugrunde liegt (ENDICOTT, 1944; DAM u. GRANADOS, 1945; HARTROFT, 1951; GEDIGK u. BONTKE, 1956; GEDIGK u. FISCHER, 1958 u. 1959; WOLMAN u. SOSHAN, 1960; HARTROFT u. PORTA, 1965; PEARSE, 1972; TAPPEL, 1973). Der Nachweis einer in vivo erfolgten Polymerisation von Autooxydationsprodukten im Rahmen der Genese von Lipopigmenten ist unlängst von HAAG, TSCHAHARAGANE u. GOERTTLER (1973) mittels des I-Bandeffectes am Lipofuscin

gelungen, daß bekanntlich eine weitgehenden Übereinstimmung der histochemischen Eigenschaften mit Ceroid aufweist.

Versucht man nun einige der wichtigsten färberischen und histochemischen Eigenschaften des Ceroids mit den erwähnten Kenntnissen der Autooxydation und Polymerisation in Beziehung zu setzen, dann wäre in erster Linie die Sudanophilie des Pigmentes zu erwähnen (zusammenfassende Literatur GEDIGK u. PIOCH, 1965; WILHELM, 1968; PORTA u. HARTROFT, 1969).

Sie geht mit einer Minderung der Löslichkeit des Pigmentes in Fettlösungsmitteln einher (zusammenfassende Literatur GEDIGK u. PIOCH, 1965; WILHELM, 1968; WOLMAN, 1964) und ist Ausdruck des oxidativen Umbaus der Lipidkomponente (GEDIGK-PIOCH, 1965). Eine Reihe von Untersuchern (ENDICOTT, 1944; DAM u. GRANADOS, 1945; HARTROFT, 1951; LILLIE, 1952 u.a.) bezogen die Sudanophilie des Pigmentes allein auf den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Nach CASSELMAN (1951) soll jedoch die Sudanophilie auf die unlöslichen Oxydations- und Polymerisationsprodukte des Lipoidbausteins zu beziehen sein. WOLMAN und SOSHAN (1960) zeigten an künstlichen, durch Autooxydation erzeugten Chromolipoiden, daß es sich um Gemische aus niedrigen und höheren Polymerisationsprodukten handelt, von denen die höheren nur eine geringe oder keine Sudanophilie mehr aufwiesen. Dies könnte die reduzierte Sudanophilie älterer Pigmentablagerungen erklären.

Der positive Ausfall der PAS-Reaktion ist seit langem bekannt und vielfach diskutiert worden (zusammenfassende Literatur (s. GEDIGK u. FISCHER, 1958 u. 1959; NEGLIA et al., 1963; WOLMAN, 1964; GEDIGK u. PIOCH, 1965; WILHELM, 1968; PORTA u. HARTROFT, 1969; THOMPSON, 1969). Die positive PAS-Reaktion wurde mitunter auf einen Gehalt an Glykoproteinen (MAEDA, 1967) oder Glykolipiden bezogen. Von CIACCIO (1950), WOLMAN (1950, 1956), CASSELMAN (1951), PEARSE (1960 u. 1972) sowie GEDIGK u. FISCHER (1958) bzw. GEDIGK u. PIOCH

(1965) wurde die positive PAS-Reaktion jedoch auf den Lipidbaustein d.h. auf die peroxydierten ungesättigten Lipide bezogen. Für diese Annahme spricht, daß auch künstlich in vitro aus Lipiden bzw. reinen Fettsäureestern durch Autooxydation (GEDIGK u. PIOCH, 1965) erzeugte ceroidartige Substanzen ebenfalls PAS-positiv sind, obwohl eine Beimengung d.o.g. Substanzen mit Sicherheit auszuschließen ist. Bei dem in den Lysosomen der Sternzellen gespeicherten Ceroid mag ein geringer Teil der positiven PAS-Reaktion auch auf einen zusätzlichen struktureigenen Glykoprotein- bzw. Glykolipidanteil zu beziehen sein, 'spielt aber sicher keine wesentliche Rolle. Auch PEARSE (1972) nimmt an, daß zumindest einige der PAS-positiven Gruppen bei in vivo gebildetem Ceroid auf die Anwesenheit eines Polysaccharids bezogen werden können. Nach WOLMAN muß auch mit einer Kopolymerisation der Fettperoxyde mit Proteinen bzw. Kohlenhydraten gerechnet werden.

Auch die Säurefestigkeit der Ceroidgranula d.h. das Festhalten von Anilinfarbstoffen auch nach Einwirkung starker Säuren ist seit langem bekannt (zusammenfassende Literatur NEGLIA et al., 1963; GEDIGK u. PIOCH, 1965; PORTA u. HARTROFT, 1965; THOMPSON, 1969). Sie konnte auch bei künstlich erzeugtem Ceroid nachgewiesen werden (CASSELMAN, 1951; GEDIGK u. PIOCH, 1965; HARTROFT u. PORTA, 1965; WOLMAN u. SOSHAN, 1960). Nach HASS (1938), GEDIGK u. PIOCH (1965) und HARMS (1965) beruht die Säurefestigkeit des Ceroids auf der Oxydation und Polymerisation der Lipide und ist durch die Anwesenheit multipler saurer Carboxylgruppen in dem lipophilen Pigmentmolekül zu erklären (WOLMAN, 1964).

An den im Zytoplasma der Sternzellen nachweisbaren Fettropfen schreitet die Säurefestigkeit zentripetal fort.

Auch für die Basophilie (GEDIGK u. PIOCH, 1965) des Pigmentes werden die autooxydierten Lipidsubstanzen verantwortlich gemacht (GEDIGK u. FISCHER, 1958; ENDICOTT und LILLIE, 1944; HARTROFT u. PORTA, 1965; CASSELMAN, 1951),

zumal sie auch bei künstlich erzeugtem Ceroidpigment nachweisbar ist und einer Ribonuclease-Extraktion widersteht (WOLMAN u. SOSHAN, 1960). Auch die Eisenbindung vom kolloidalen Eisen nach HALE und die Blaufärbung des Pigmentes im eingebetteten Material mit Nilblau-Sulfat sind durch die Anwesenheit saurer Gruppen zu erklären und somit auf die Basophilie des Pigmentes zu beziehen.

Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion zur Darstellung von Äthylengruppen ist in Übereinstimmung mit LILLIE (1952), GEDIGK, FISCHER (1958), GEDIGK, PIOCH (1965), PEARSE (1972) von Versuchsbeginn an positiv und nimmt im weiteren Verlauf nur gering zu. Es erhebt sich allerdings die Frage, ob mit dieser Reaktion tatsächlich nur Äthylengruppen erfaßt werden, da deren Zahl bei der Peroxydation abnimmt. Da die Schiff'sche Reaktion für Aldehyde am Ceroidpigment ebenfalls schwach positiv ausfällt (GEDIGK-FISCHER, 1958), könnte die Frage gestellt werden, ob nicht solche freie Aldehyde, die bei der spontanen Peroxydation der Lipide gebildet werden, mit dem bei der PFAS-Reaktion verwendeten Schiff'schen Reagenz reagieren. Für die Anwesenheit von Disulfidgruppen, die mit der PFAS-Reaktion ebenfalls reagieren können, ergeben sich nach GEDIGK und PIOCH (1965) keine verbindlichen Anhaltspunkte. Die Ninhydrin-Schiff-Reaktion für alpha-Aminosäuren ist vom 2. Tag an sehr schwach positiv, so daß in Übereinstimmung mit GEDIGK und PIOCH (1965) auf die Anwesenheit von Eiweiß geschlossen werden kann; möglicherweise handelt es sich dabei um das Fermenteiweiß der nachgewiesenen Hydrolasen.

Die Anwesenheit reduzierter Gruppen wird durch die Chèvre-mont-Frédéric-Reaktion gezeigt (GEDIGK u. PIOCH, 1965). Der positive Reaktionsausfall wird nach WOLMAN (1964) durch Carbonylgruppen erklärt, die während der Oxydation der Lipide gebildet wurden oder durch noch vorhandene Äthylengruppen.

Die Befunde der Berliner-Blau-Reaktion verdienen besondere Beachtung. Wie in Tabelle III niedergelegt, war im Ceroidpigment während der ganzen Versuchsdauer kein Eisen nachweisbar. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von LILLIE (1949). GEDIGK u. FISCHER (1958, PORTA u. HARTROFT (1969), THOMPSON (1966, 1969). Allerdings werden von einzelnen Autoren auch eisenpositive Ceroidpigmente angegeben (LEE, 1950; SCHMIDT, 1953; CASSELMAN, 1951; TRAUTWEIN, 1962).

In Übereinstimmung mit GEDIGK u. FISCHER (1958), THOMPSON, 1966; PORTA u. HARTROFT (1969); THOMPSON (1969) möchten wir diese Befunde so interpretieren, daß Eisenpigmentablagerungen häufig gemeinsam mit Ceroid vorkommen, jedoch nicht als integraler Bestandteil des Pigmentes anzusehen sind. Fluoreszenzmikroskopisch läßt sich das nicht-fluoreszierende Eisenpigment leicht vom fluoreszierenden Ceroid unterscheiden. Im Hinblick auf die viel diskutierte Rolle der Erythrozyten oder ihrer Bestandteile an der Genese des Ceroids können Haemosiderinablagerungen sicher nicht nur als zufälliges Begleitphaenomen angesehen werden (siehe weiter hinten Seite 67).

C. Welche Beziehungen bestehen zwischen den elektronenmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen bzw. histochemischen Befunden der Ceroidgranula?

Elektronenmikroskopisch (wie aus den Befunden von Kajihara, Totovic und Gedigk - mündliche Mitteilung - hervorgeht) zeigten sich bereits nach 12 Stunden Umbauvorgänge an den Fettropfen in den Lipophagosomen in Form von amorphen, von der Peripherie zum Zentrum fortschreitenden Verdichtungen. Nach 24 Stunden waren diese Verdichtungen weiter zum Zentrum fortgeschritten. Ihnen dürften die am 1. Tag lichtmikroskopisch zu beobachtenden feinen fluoreszierenden Ringe am Rande der Fettvacuolen in den Sternzellen entsprechen. Bei diesem fluoreszierenden Material handelt es sich offensichtlich um die bei der Gewebseinbettung nicht mehr herausgelösten oxydierten und polymerisierten sowie bereits säurefesten Randschichten der Fettröpfchen.

Am dritten Tag war elektronenmikroskopisch kein gespeichertes Fett in den stark verdichteten Lipophagosomen mehr nachweisbar. Sie enthielten unregelmäßige, mehr oder minder stark verdichtete lamelläre Strukturen, die in ein feinkörniges oder amorphes Material eingebettet sind. Diese jetzt elektronenmikroskopisch als Propigment anzusprechenden Gebilde entsprechen den deutlich konturierten, hellgelblich fluoreszierenden, unterschiedlich großen und eingebuchteten Granula, in denen sich mitunter auch lamelläre und fingerförmige Strukturen erkennen ließen. Diese Granula wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits das färberische, histochemische und fluoreszenzmikroskopische Verhalten des Ceroids auf, d.h. sie waren sudanophil, säurefest, PAS-positiv und zeigten eine Eigenfluoreszenz. Am 5. Tag zeigten sich elektronenmikroskopisch weitere Verdichtungen und Verkleinerungen der Pigmentgranula, die jetzt ein stark osmiophiles, elektronendichtes Material enthielten. Auch das von PORTA (1963) sowie von HARTROFT und PORTA (1965) experimentell in vitro erzeugte ceroidartige Pigment erwies sich elektronenmikros-

kopisch als ein in Fettlösungsmitteln unlösliches stark osmiophiles Material, das histochemisch alle Charakteristika des Ceroids aufwies. Diesem elektronenmikroskopischen Befund entspricht zeitlich eine weitere Farbverschiebung der Ceroidgranula nach schwach hellgelb, offenbar bedingt durch eine zunehmende Polymerisation der Oxydationsprodukte der ungesättigten Fette.

Während der folgenden 12 Wochen änderten sich die färbereichen und histochemischen Eigenschaften der Ceroidgranula, abgesehen von geringen Farbnuancierungen, nicht wesentlich. Die Eigenfluoreszenz nahm allerdings deutlich ab. Elektronenmikroskopisch zeigten sich in diesem Zeitraum weiter verdichtende Pigmentgranula, die sich zu 'dense bodies' umwandelten.

Es zeigte sich also, daß die elektronenmikroskopischen Umbauvorgänge der Lipophagosomen von entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen, histochemischen und färbereichen Veränderungen der Ceroidgranula begleitet werden. Auf elektronenmikroskopischem Niveau bestätigt sich darüberhinaus die bereits früher von HASS (1938) und CASSELMAN (1951) an in vitro erzeugtem ceroidartigem Material und bei in vivo gebildetem Ceroidpigment festgestellte Beobachtung (ENDICOTT, 1944; GEDIGK und PIOCH, 1965; HARTROFT und PORTA, 1965 u.a.m.), daß die Lipidoxydation zuerst an der Außenseite der Fetttropfen beginnt, d.h. an der aktiven Kontaktfläche.

D. Welche Rolle spielen lysosomale Enzyme bei der Ceroidgenese?

Bereits 1956 berichteten GEDIGK und BONTKE über enge Beziehungen zwischen der Bildung des Ceroids im Ovar und dem Auftreten hydrolytischer Enzyme. Sie nahmen an, daß als Folge der Lipidaufnahme im Zytoplasma der Phagozyten saure Phosphatasen und Esterasen entstehen oder aktiviert werden und diskutierten die Möglichkeit, daß das Pigment oder seine Vorstufen Substrate dieser Enzyme sein könnten. Auch bei der Ceroidbildung im Rahmen experimenteller haemorrhagischer Fettgewebsnekrosen sahen sie schon nach kurzer Zeit einen erheblichen Anstieg der sauren Phosphatase und eine inkonstante bis schwache Vermehrung der unspezifischen Esterase bzw. Lipase (GEDIGK und FISCHER, 1958). Nach intravenöser Injektion von Lipidemulsionen (THOMPSON, 1969) wurde ebenfalls saure Phosphatase im Bereich der Ceroidablagerungen in den Sternzellen nachgewiesen (weitere Literatur siehe dort). HARTROFT und PORTA (1965) sowie PORTA und HARTROFT (1969) zeigten elektronenmikroskopisch ceroidhaltige Phagosomen in den Sternzellen, die saure Phosphatase an ihrer Peripherie aufwiesen. Daneben war das Ferment zum großen Teil frei im Zytoplasma zu sehen.

Bei den eigenen Untersuchungen konnte zwischen dem 3. und 5. Tag nach Injektion einer Lebertranemulsion ein Anstieg der sauren Phosphatase in den ceroidhaltigen Sternzellen festgestellt werden, mit einem Maximum am 5. Tag. In Übereinstimmung mit GEDIGK und BONTKE bzw. GEDIGK und FISCHER (1958) dürfte es sich bei dem Anstieg der sauren Phosphatase um eine Reaktion der Sternzelle auf die Phagozytose der Fettsubstanzen handeln.

Elektronenmikroskopisch war allerdings eine Vermehrung der hydrolasehaltigen Lipophagosomen und eine Hypertrophie des Golgi-Apparates schon früher, nämlich am 1. Tag nachzuweisen. (Kajihara, Totovic, Gedigk, persönliche Mitteilung)

Die Annahme, daß es sich bei dem beobachteten Anstieg der sauren Phosphatase um eine Reaktion auf den Phagozytosevorgang handelt, wird u.a. gestützt durch Angaben von CARR (1973), daß auch bei einer Stimulation der Sternzellen nach Injektion von Metallsalzen, Dextran usw. ein gleichartiger Anstieg der sauren Phosphatase zu beobachten ist. Offenbar handelt es sich um die stereotype Reaktion der Sternzellen und Makrophagen auf die Phagozytose von Stoffen, die zum Teil oder ganz abgebaut werden können (GEDIGK und BONTKE, 1956; GEDIGK und FISCHER, 1960).

Da bei den vorliegenden Untersuchungen das Maximum des Anstiegs der sauren Phosphatase zu einem Zeitpunkt vorlag, an dem entsprechend den histochemischen Befunden die phagozytierten Lipide bereits weitgehend oxydiert und polymerisiert waren, liegt die Annahme nahe, daß die Enzymaktivität in keiner Beziehung zu diesen Umwandlungsprozessen steht.

Wie bereits oben ausgeführt, beschrieben PORTA und HARTROFT (1969) saure Phosphatase in der Umgebung und im Inneren der Ceroidgranula. Lichtmikroskopisch kann bei den vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden, ob dieses Ferment auch in den Granula enthalten war; es lag zumeist in der Umgebung oder in Einbuchtungen der Granula. Für die Angaben von PORTA und HARTROFT bieten sich aus lichtmikroskopischer Sicht jedoch zwei Erklärungen an: Bei den Ceroidgranula handelt es sich um polymorphe, eingebuchtete Gebilde. Liegt die Schnittebene senkrecht zu den Einbuchtungen, in denen Enzymaktivität vorliegt, so erscheint es, daß das Ferment im Granulum enthalten ist. Darüberhinaus kann es während der Konfluenz der Lipidtröpfchen in den Phagolysosomen im Verlauf ihrer Vereinigung mit den hydrolasehaltigen praeexistenten Lysosomen zum Einschluß von Ferment in die Lipidmassen kommen, so daß Enzymaktivität in den Granula nachweisbar wird.

Im Rahmen ihrer Untersuchungen über das Vorkommen von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten stellten GEDIGK und BONTKE (1956) fest, daß die Reaktion für unspezifische Esterase im Ceroid der Sternzellen unregelmäßig positiv ausfiel. Auch nach einer experimentellen haemorrhagischen Fettgewebsnekrose wurde eine schwache Esterase- und eine schwache inkonstante Lipaseaktivität in den fett-speichernden Makrophagen beobachtet (GEDIGK und FISCHER, 1958). Weitere Literaturangaben finden sich bei PORTA und HARTROFT (1969).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Vermehrung der unspezifischen Esterase in den Sternzellen in relativ geringer jedoch gleichbleibender Menge sowie vom 2. bis 4. Tag eine schwach positive Lipasereaktion nachgewiesen werden. Zu allen anderen Zeitpunkten fiel die letzte Reaktion inkonstant bzw. schwach positiv aus.

Ob diesen Lipasen und Esterasen bei der Genese des Ceroids tatsächlich eine Rolle zugesprochen werden kann, ist aufgrund unserer Versuche nicht zu klären, obwohl dies theoretisch denkbar wäre. Immerhin könnten die elektronenmikroskopischen Befunde für diese Annahme sprechen, da Veränderungen vorliegen, die als Zeichen eines geringfügigen Fettabbaus gedeutet werden können. An den eigentlichen Umwandlungsprozessen der phagozytierten Fettsubstanzen zum Ceroidpigment dürften die drei Enzyme nicht obligat beteiligt sein, da sie auch in vitro reproduziert werden können.

E. Sind Erythrozyten oder ihre Bestandteile bei der Pigmentgenese beteiligt?

Seit fast 23 Jahren ist es bekannt, daß beim lokalen Erythrozytenabbau ein fetthaltiges, eisenfreies Pigment auftritt, das ursprünglich als "Hämfuscin" bezeichnet wurde und mit Ceroid identisch ist. Hinweise über die Mitwirkung von Erythrozyten an der Entstehung des Ceroidpigmentes liegen schon geraume Zeit vor. HAMPERL (1934, 1950) faßte die Entstehung des Ceroids als Ausdruck einer eigentümlichen Verarbeitung der beim lokalen Blutzerfall freiwerdenden Stoffe durch die Makrophagen auf. Er wies darauf hin, daß Ceroid auch in Organen außerhalb der Leber vorkommt (s. dazu auch PEARSE, 1972), und zwar dort, wo Blutungen stattgefunden haben. ZOLLINGER (1953) und SCHMIDT (1953) sind ebenfalls der Meinung, daß ein lokaler Erythrozytenabbau bei der Ceroidgenese eine wesentliche Rolle spielt. Auch GEDIGK und FISCHER (1958) brachten aufgrund experimenteller Untersuchungen die Ceroidgenese mit vorangehendem Abbau von Fett aus nekrotischen, von Hämorrhagien durchsetzten Fettgeweben in Zusammenhang. Sie vertraten die Ansicht, daß das Freiwerden des Hämoglobins die Oxydation der im Fettgewebe enthaltenen ungesättigten Fettsäuren begünstige. HARTROFT und PORTA (1965) zeigten, daß injizierte Lipide sowie Erythrozyten in autophagische Vakuolen der Sternzellen aufgenommen werden können, wo sie sich nach ihrer Vereinigung zu Ceroid umwandeln. KORB und MÜHLBERGER (1970) beschrieben Ceroidablagerungen in den Sternzellen nach vorheriger Erythrophagie infolge der Einwirkung einer hämolysierenden Substanz (Pyrogallol).

Auch bei unserer Versuchsanordnung ergaben sich Hinweise auf eine temporäre Hämolyse kurz nach der Injektion der Lipidemulsion, in Form einer kurzfristigen Hämaturie. THOMPSON (1969) zitiert mehrere Autoren, die über die Entwicklung einer offenbar hämolytischen Anämie nach der mehrmaligen Injektion von Lipidemulsionen berichten.

Experimentelle Untersuchungen, bei denen Hämoglobin-Lipid-emulsionen bzw. Erythrozyten-Lipidgemische zur Bildung ceroidartiger Pigmente in vitro führten, bestätigen die Meinung, daß Erythrozyten bzw. Hämoglobin bei der Bildung von Ceroid beteiligt sein können. Das neugebildete Pigment wies alle für Ceroid geforderten färberischen, fluoreszenzmikroskopischen und histochemischen Eigenschaften auf. HARTROFT (1951); CASSELMAN (1951); GEDIGK und FISCHER (1958); WOLMAN-SOSHAN (1960); PORTA (1963); HARTROFT und PORTA (1965) u.a.m.

Die Wirkung des bei einer allgemeinen oder lokalen Hämolyse freiwerdenden Hämoglobins wurde in der Literatur zu- meist als katalytisch interpretiert (GEDIGK, 1958; THOMPSON, 1969; MITTELSTAEDT, 1971). Hämoproteine sind mächtige Katalysatoren der Lipoperoxydation (EULER, 1934; TAPPEL, 1973). Nach EULER kommt es bei der Hämoglobin katalysierten Oxydation der ungesättigten Fettsäuren - genau wie bei der unkatalysierten Oxydation ungesättigter Fette - zur Anlagerung von Sauerstoff an die Doppelbindungen. TAPPEL (1955) bzw. MITTELSTAEDT (1971) stellten allerdings fest, daß neben Hämoglobin auch Myoglobin und Zytochrome als Katalysatoren wirksam sein können.

Während sich die bisherigen Untersuchungen mit der Bedeutung des aus den Erythrozyten freiwerdenden Hämoglobins befaßten, nahm MAEDA (1967) aufgrund seiner Untersuchungen Beziehungen zwischen dem Erythrozytenstroma und einer Ceroidbildung an.

Im Nebenversuch untersuchten wir daher, ob injiziertes Erythrozytenstroma eine Pigmentbildung induziert. Dabei wurde der 7. Versuchstag ausgewählt, um sicher zu sein, daß ein fortgeschrittenes Stadium der Pigmentgenese untersucht wird.

Tatsächlich ließ sich ein sehr feinkörniges sudanophiles Pigment in den Sternzellen nachweisen, das eine schwache

zitronengelbe Eigenfluoreszenz, eine Säurefestigkeit und eine positive PAS-Reaktion aufwies. Auch die Perameisensäure-Schiff-Reaktion, die Ninhydrin-Schiff-Reaktion und die Chèvremont-Frédéric-Reaktion fielen positiv aus. Demnach handelt es sich also um ein ceroidartiges, allerdings sehr feinkörniges Pigment.

Da nach PRANKERD (1961) bei der Isolierung des Stromas trotz mehrfachen Waschens bei Fraktionen noch immer 2 % des Hämoglobins an das Stroma gebunden bleiben, könnte in Betracht gezogen werden, daß der geringe Lipidanteil der Membranen selbst einer Hämoglobin katalysierten Peroxydation unterworfen wird.

CASSELMAN (1951), der in vitro die Einwirkung von Erythrozyten bzw. ihrer Bestandteile auf die Ceroidbildung untersuchte, fand, daß das Stroma die Transformation von Lipiden zu Pigment weitaus schwächer stimulierte als Erythrozyten bzw. Hämoglobin.

Faßt man also die geschilderten Beobachtungen zusammen, so ergibt sich die Schlußfolgerung, daß der Erythrozyt als Ganzes bzw. sein Hämoglobinanteil in vivo und in vitro die Entstehung des Pigmentes katalytisch beeinflussen und beschleunigen kann, obwohl seine Mitwirkung an der Pigmentgenese nicht obligatorisch ist.

Das Erythrozytenstroma selbst ist aufgrund seines Gehaltes an strukturgebundenen vielfach ungesättigten Fettsäuren labil für eine Lipo-peroxydation (HOCHSTEIN, 1966; KANN, 1966, zitiert nach TAPPEL, 1973).

Auch wenn es sich nicht endgültig beweisen läßt, ob und in welchem Umfang die Erythrozytenmembran an der Ceroidgenese beteiligt ist, so wäre es jedoch nicht abwegig, dies hypothetisch anzunehmen.

IX. Zusammenfassung

1. Nach einmaliger intravenöser Lipidinjektion (Lebertranemulsion) tritt im Laufe der Zeit in den Sternzellen der Leber von Ratten ein gelblich bis braun fluoreszierendes, sudanophiles, säurefestes Lipopigment auf, das aufgrund seiner licht- sowie fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Eigenschaften dem Ceroid ähnlich oder sogar mit ihm identisch ist.

2. Die saure Phosphataseaktivität und die Aktivität der anderen untersuchten Hydrolasen während der Anfangsstadien der Lipopigmentgenese kann mit großer Wahrscheinlichkeit als Reaktion auf die Phagozytosefähigkeit der Sternzellen gewertet werden und dürfte nicht mit den Alterungsprozessen des Pigmentes zusammenhängen.

Eine etwaige Katalysatorfunktion der sauren Phosphatase oder der anderen untersuchten Enzyme bei der Ceroidgenese konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist anzunehmen, daß Hämoglobin die Autoxydation der ungesättigten Lipide und somit die Genese des Pigmentes beschleunigt.

3. Nach einmaliger Injektion von Erythrozytenstroma kann in den Sternzellen der Leber von Ratten ein ceroidähnliches Pigment beobachtet werden, das offenbar aus den ungesättigten Lipiden des Stomas durch Autoxydation gebildet wird.

X. Summary

1. After a single intravenous injection with lipid (cod liver oil-emulsion) there can be observed after a certain period in the cupffer'cells of rat liver a yellowish - brown fluorescent, sudanophil, acid fast lipopigment that is similar or even identical to ceroid on the bases of its lightmicroscopical and fluorescent as well as its electron-microscopical characteristics.

2. The activity of acid phosphatase and the activity of some other examined hydrolases during the initial period of the genesis of lipopigment is most probably a reaction of the activity of phagocytosis of the cupffer'cells and does not depend on the genesis of the pigment.

An eventual catalyzing function of the acid phosphatase or of the other examined enzymes concerning the genesis of ceroid could not be proved. It can, however, be supposed that hemoglobin accelerate the autooxidation of unsaturated lipids and consequently the genesis of the pigment.

3. After a single injection with stroma of red cells there can be observed in the cupffer'cells of livers of rats a pigment similar to ceroid that is obviously formed by auto-oxidation out of the unsaturated lipids of the stroma.

XI.



Abb. 6: Eigenfluoreszenzpräparat, fluoreszierende Ceroidgranula 4 Tage nach Injektion einer Lebertranemulsion. Deutlich erkennbare Strukturen in den Ceroidgranula. 2 μ dicker Parablastschnitt. (OK 16/Obj. 100 ÖI)

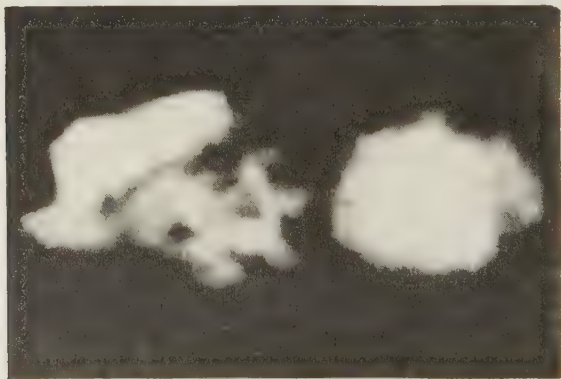


Abb. 7: Eigenfluoreszenz, fluoreszierende Ceroidgranula 14 Tage nach Injektion einer Lebertranemulsion. 2 μ dicker Parablastschnitt. (OK 16/Obj. 100 ÖL)

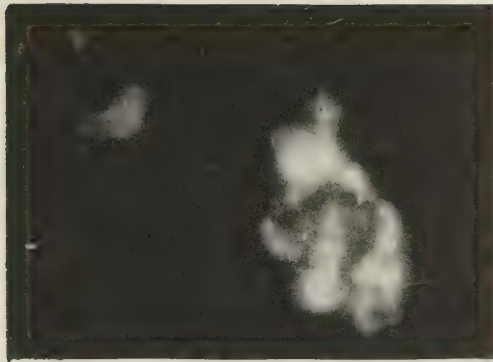


Abb. 8: Eigenfluoreszenz, fluoreszierende Ceroidgranula 6 Wochen nach der intravenösen Injektion der Lebertranemulsion. 2 μ dicker Parablattschnitt. (OK 16/Obj. 100 ÖL)

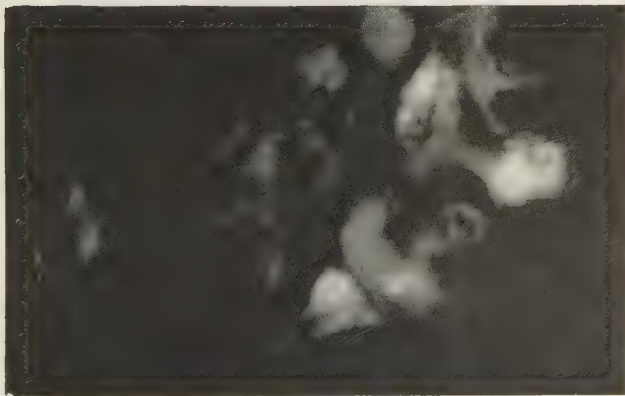


Abb. 9: Eigenfluoreszenz, fluoreszierende ceroidähnliche Lipopigmentgranula in den Sternzellen. 7 Tage nach intravenöser Injektion von Erythrozytenstroma. Deutlich erkennbares feingranuläres Material. (OK 16/Obj.100 ÖL)



Abb. 10: Nachweis der sauren Phosphomonoesterase nach GOMORI.
5 Tage nach intravenöser Injektion der Lebertranemulsion. Sternzelle mit großer Enzymaktivität; CE = Ceroid. 10 μ dicker Kryostatschnitt. (OK 10/Obj.100 ÖL)



Abb. 11: Nachweis der Lipase nach BARKA (TWEEN-Methode);
Fluoreszenzbild. 3 Tage nach intravenöser Injektion der Lebertranemulsion. LI=Lipaseaktivität, CE=Ceroid.
Die Enzymaktivität ist kranzartig um das fluoreszierende Ceroidgranulum angeordnet. 10 μ dicker Kryostatschnitt. (OK 10/Obj.100 ÖL)

XII. Literaturhinweis

- ARNOLD, M. (1968): Histochemie, Berlin-Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- AXLINE, S.G. und COHN, Z.A. (1970): In vitro induction of lysosomal enzymes by phagocytosis. The J. of exp. med., 131, No. 6, 1239-1260.
- BARKA, T. and ANDERSON, P.J. (1963): Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography. New York, Evanston und London: Harper & Row.
- CAMPBELL, C.R. (1971) : Statistische Methoden für Biologie und Medizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- CARR, I. (1973): The macrophage. A review of ultra-structure and function. London, New York: Academic Press.
- CASSELMAN, W.G.B. (1951): The in vitro preparation and histochemical properties of substances resembling ceroid. J. exp. med. 94, 549-562.
- CAVALLI-SFORZA, L. (1972): Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- CIACCIO, C. (1950): Contributo all'istochimica dei lipoidi. I. Struttura dei cromolipoidi. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 26, 534-535.
- DAM, H. und GRANADOS, H. (1945): Peroxidation of body fat in vitamin E-deficiency. Acta physiol. scand. 10, 162-171.
- DAM, H. und GRANADOS, H. (1945): Role of unsaturated fatty acids in changes of adipose and dental tissues in vitamin E-deficiency. Science 102, 327-328.

- DAVIS, C.L. und GORHAM, J.R. (1954): The pathology of experimental and natural cases of "Yellow Fat" disease in swine. *Am. J. vet. Res.* 15, 55-59.
- DEBUCH, H., CLARA, M. (1965): Handbuch der Histochemie, Band V, Teil 1, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- DE DUVE, Ch. (1961): The lysosome in retrorespect. In: DINGLE, J.T. und FELL, H.B. (1961): Lysosomes in biology and pathology. Band 1, 3-40, Amsterdam, London.
- DE DUVE, Ch. (1963): The lysosome. *Scientific American* 20, 64-72.
- DE DUVE, Ch. (1966): Die Funktion der Lysosomen. In: HEISTER, R. und HOFMAN, H.E. (1966): Die Entzündung, S. 150-151, München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg.
- DE DUVE, Ch. und WATTIAUX, R. (1966): Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28, 435-492.
- DODD, D.C., BLAKELY, A.A., THORNBURY, R.S. und DEWES, H.F. (1960): Muscle degeneration and yellow fat disease in foals. *The New Zealand Veterinary Journal* 8, 45-50.
- DOGGE, J.T., MITCHEL, C. und HANAHAN, D.J. (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem.* 100, 119-130.
- ESSNER, E. und NOVIKOFF, A.B. (1960): Human hepatocellular pigments and lysosomes. *J. Ultrastructure Res.* 3, 374-391.
- EULER, von H. (1934): Chemie der Enzyme, Teil II, 3. Abschnitt, S. 89-90, München: Bergmann.
- ELLIS, G.W. (1950): Autooxidation of the fatty acids. 3. The oily products from elaidic and oleic acids. The formation of monoacyl derivatives of dihydroxystearic acid and of alpha-8-unsaturated keto acids. *Bio-*

- chem. J. 46, 129-141.
- ENDICOTT, K.M. (1944): Similiarity of the acid-fast pigment ceroid and oxidized unsaturated fat. Arch. Path. 37, 49-53.
- ENDICOTT, K.M. und LILLIE, R.D. (1944): Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats, its characteristics and its differentiation from hemofuscin. Amer. J. Path. 20, 149-153.
- FARMER, E.H. und SUTTON, D.A. (1943): The course of autoxidation reaction in polyisoprenes and allied compounds. Part. IV. The isolation and constitution of photochemically-formed methyl oleate peroxide. J. chem. Soc. 1, 119-122.
- FRIEND, D.S. und FARQUHAR, M.G. (1967): Functions of coated vesicle during protein absorption in the rat vas deferens. J. Cell. Biol. 35, 357-376.
- GEDIGK, P. (1952): Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. Kli. Wschr. 1057-1065.
- GEDIGK, P. (1956): Histochemische Methoden. In: Biochemisches Taschenbuch, S. 855-891. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer Verlag.
- GEDIGK, P. und BONTKE, E. (1956): Zur Genese der Lipopigmente. Sonderdruck aus: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 40. Tagung, 1956, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag (1957)
- GEDIGK, P. und BONTKE, E. (1956): Über den Nachweis von hydrolytischen Enzymen in Lipopigmenten. Z. Zellforschung 44, 495-518.
- GEDIGK, P. und FISCHER, R. (1958): Über die Entstehung des Ceroidpigmentes bei der hämorrhagischen Fettgewebsnekrose. Virchows Arch. path. Anat. 331, 341-370.

- GEDIGK, P. und FISCHER, R. (1959): Über die Entstehung von Lipopigmenten in Muskelfasern. Untersuchungen beim experimentellen Vitamin-E-Mangel der Ratte und an Organen des Menschen. Virchows Arch. path. Anat. 332, 431-468.
- GEDIGK, P. und FISCHER, R. (1960): Über die Anpassung der Enzymaktivität von Histiocyten an funktionelle Leistungen. Kli. Wschr. 806-809.
- GEDIGK, P. und TOTOVIC, V. (1964): Histochemische Methoden. In: Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, S. 437-494. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer Verlag
- GEDIGK, P. und PIOCH, W. (1965): Über die formale Genese lipogener Pigmente. Virchows Arch. 339, 100-135.
- HAAG, D., TSCHAHARAGANE, C. und GOERTTLER, K. (1973): Untersuchungen zur Polymerisation von Lipofuscin mittels I-Band-Effekt. Virchows Arch. path. Anat. 361, 139-145.
- HAMPERL, H. (1934): Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Gewebe. Virchows Arch. path. Anat. 292, 1-51.
- HAMPERL, H. (1950): Über fluoreszierende Körnchenzellen "Fluorocyten". Virchows Arch. path. Anat. 318, 32-47.
- HARMS, H. (1965): Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort: Staufen Verlag.
- HARTROFT, W.S. (1951): In vitro and in vivo production of ceroid like substances from erythrocytes and certain lipids. Science 113, 673-674.
- HARTROFT, W.S. und PORTA, E.A. (1965): CEROID. Am. J. Med. Sci. 250, 324-345.

- HASS, G.M. (1938): Tissue reactions to natural oils and fractions thereof. Arch. Path. 26, 956-965.
- HASS, G.M. (1938): Intercellular transformations of unsaturated fatty acids and esters. Arch. Path. 26, 1196-1207.
- HASS, G.M. (1939): Membrane formation at lipid-aqueous interfaces in tissues. Arch. Path. 27, 177-198.
- HOCHSTEIN, P. (1966): In: Proc. 3rd International Conference on Hyperbaric Medicine, (1965), S. 61, hrsg. von BROWN, I.W. und COX, B.G., Washington D.C.: National Academy of Sciences, National Research Council.
- HOLMAN, R. und BERGSTÖM, S. (1951): Lipoxidase or unsaturated fat oxidase. In: SUMNER und MYRBÄCK: The Enzymes. S. 559-580. New York: Academic Press Inc., Publishers.
- HOLMAN, R.T. (1953): Mode of action of lipoxidase. Trans. Amer. Ass. Cereal Chemists. 11, 135-146.
- JACQUES, P.J. (1960): Endocytosis. In: DINGLE, J.T. und FELL, H.B.: Lysosomes in biology and pathology, Vol. 2., S. 395-420, Amsterdam, London.
- KAJIHARA, H., TOTOVIC, V., GEDIGK, P. (1974): Persönliche Mitteilung. (siehe auch KAJIHARA, H., TOTOVIC, V., GEDIGK, P. und BECHTEL-SHEIMER (1974): Zur Ultrastruktur und formalen Genese des Ceroidpigmentes. Verh. Dtsch. Ges. Path. 58, 523.)
- KANN, H.E. und MENGEL, C.E. (1966): In: BROWN, I.W. und COX, B.G., Proceedings 3rd International Conference on Hyperbaric Medicine, (1965), S. 65, Washington, D.C.: National Academy of Sciences, National Research Council.

- KISZELY-POSALAKY (1964): Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. Budapest: Akademiai Kiado.
- KORB, G. und MÜHLBERGER, G. (1970): Lichtmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen in den Sternzellen der Leber nach Erythrophagie. Virchows Arch. Abt. Zellpath. 5, 268-276.
- LEE, C.S. (1950): Histochemical studies of ceroid pigment of rats and mice and its relation to necrosis. J. of the National Cancer Institute 11, 339-346.
- LEMPERLE, G. und REICHELT, M. (1973): Der Lipofundin-Clearence Test. Med. Klin. 68, 48-53.
- LILLIE, ASHBURN, SEBRELL, DAFT und LOWRY (1942): Histogenesis and repair of the hepatic cirrhosis in rats produced on low protein diets and preventable with choline. Publ. Health Rep. 57, 502-508.
- LILLIE, R.D., DAFT, F.S. und SEBRELL, W.H. (1941): Cirrhosis of the liver in rats on a deficient diet and the effect of alcohol. Publ. Health Rep. 56, 1255-1258.
- LILLIE, R.D. (1949): Histogenesis Technique and practical histochemistry. New York: Mc Graw Hill.
- LILLIE, R.D. (1952): Ethylenic reaction of ceroid with performic acid and Schiff-reagent. Stain Technol. 27, 37-45.
- LILLIE, R.D. und BANGLE, R. (1954): The peracetic acid Schiff reaction of hair cortex. J. Histochem. Cytochem. 2, 300-311.
- LIPP, W. (1959): Histochemische Methoden. XVII, München: R. Oldenburg.

- LUFT, J.A. (1961): Improvements in Epoxy resin embedding methode. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414.
- LUNDBERG, W.O. (1956): Durch Lipoxidase katalysierte Oxidation polyungesättigter Fettsäuren. Fette, Seifen, Anstrichmittel 58, 329-331.
- MAEDA, R. (1967): The origin of ceroid. Acta Path. Jap. 17, 439-456.
- MASON, K.E. und HARTSOUGH, G.R. (1951): "Steatitis" or yellow fat in mink, and its relation to dietary fats an inadequacy of vitamin E. Am. vet. Med. Ass. 119, 72-75.
- MILLONIG, G. (1961): A modified procedure for bad staining of thin sections, J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 736-739.
- MILLONIG, G. (1962): Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. Vth International Congress off Electronmicroscopy, Philadelphia 1962, Vol. 2. S. 8., New York-London: Academic Press.
- MITTELSTAEDT, W. (1971): Die Ceroidose. D M W 96, 647-651.
- NEGLIA, W., BURROWS, L., THOMPSON, S.W. und SCHAFFNER, F. (1963): Ultrastructural studies of hepatic pigment following administration of intravenous fat. Lab. Invest. 12, 378-385.
- NOVIKOFF, A.B. (1973): Lysosomes. A personal account. In: HERS, H.G. und HOOF, van F., (1973): Lysosomes and storage diseases. New York, London: Academic Press.
- PEARSE, A.G.E. (1960): Histochemistry, Theoretical and Applied, II. Edition. London: J.A. Churchill Ltd.

- PEARSE, A.G.E. (1972): Histochemistry, Theoretical and Applied, III Edition. Edinburgh and London: Churchill Livingstone.
- POPPER, GYÖRGY und GOLDBLATT (1949): AMA Arch. of Path. 37, 161 (1944), zitiert nach SCHMIDT, R. (1953): Über das Vorkommen von ceroidhaltigen Zellen (Fluorocyten) in der Leber. Virchows Arch. 323, 123-132.
- PORTA, E.A. (1963): Experimental electron microscopic study of the sequential stages of in vitro formation of ceroid. Exp. molec. Path. 2, 219-233.
- PORTA, E.A. und HARTROFT, W.S. (1969): Lipid pigments in relation to aging and dietary factors (lipofuscins). S. 191-235. In: WOLMAN, M. (1969): Pigments in the pathology. New York und London: Academic Press.
- FRANKERD, T.A.J. (1961): The red cell, an account of its chemical physiology and pathology. S. 15. Oxford: Blackwell, Scientific Publications.
- SEDLACEK, B.A. J. (1958): Quantitative Methoden zur Bestimmung der Ranzigkeit von Pflanzenölen. Nahrung 2, 655-659.
- SEDLACEK, B.A.J. (1963): Studium der UV-Spektren der auf höhere Temperatur erhitzten Öle, Nahrung 7, 367-374.
- SEDLACEK, B.A.J. (1966): Studium der UV-Spektren flüchtiger Produkte, die bei der thermischen Oxydation und Autoxidation von Fetten entstehen. Fette-Seifen-Anstrichmittel 68, 725-731.
- SEDLACEK, B.A.J. (1969): Anwendung der UV-Spektrophotometrie bei der Untersuchung der Oxydation und Polymerisation von Fetten. Fette-Seifen-Anstrichmittel 71, 133-137.

- SEDLACEK, B.A.J. und RUBIN, R. (1959): Die Bestimmung des Ranzigkeitsgrades der Fette durch die kolorimetrische Methode mit Diphenylcarbid. Fette-Seifen-Anstrichmittel 61, 134-138.
- SCHMIDT, R. (1953): Über das Vorkommen von ceroidhaltigen Zellen ("Fluorocyten") in der Leber. Virchows Arch. 323, 123-132.
- SCHOLLER, K.L. (1973): Zur Speicherung verschiedener Fett-emulsionen in den Retikuloendothelzellen der Leber. Med. Welt 24, Heft 29/30, 1179-1181.
- TAPPEL, A.L. (1955): Studies on the mechanism of vitamin E-action. III. In vitro Copolymerisation of oxidized fats with protein. Arch. Biochem. 54, 266-280.
- TAPPEL, A.L. (1973): Lipid peroxydation damage to cell componentes. Fed. Proc. 32, 1870-1874.
- TAPPEL, A.L. (1973): In: lysosomes and storage diseases. Vol. 2. S. 547-554. hrsg. von HERS, H.G. und HOOFF, van F. (1973): New York und London: Academic Press.
- THOMPSON, S.W. (1966): Selected histochemical and histopathological methods. Springfield; Illinois, USA: C.C. Thomas Publisher.
- THOMPSON, S.W. (1969): Lipogenic pigments related to treatment with exogenous lipid. S. 237-286. In: WOLMAN, M. (1969): Pigments in the pathology. New York, London: Academic Press.
- THOMPSON, S.W., JONSON, F.B. und FORBES, A.L. (1958): Staining characteristics of a pigment associated with intravenous fat alimentation. Lab. Invest. Vol. 7, 533-543.

- THOMPSON, S.W., FOX, A.B., HARRISON, M. und FORBES, A.L.
(1960): Influence of fixatives, solvents and bleaches on intravenous fat pigment. Lab. Invest. Vol. 9, 216-227.
- THOMPSON, S.W., FOX, A.B. und THOMASSEN, R.W. (1960): Residual pigment associated with intravenous fat alimentation. Amer. J. Path. 36, 355-360.
- TRAUTWEIN, G. (1960): Untersuchungen über ein Lipopigment in der Leber des Schafes, Arch. für exp. Veterinärmedizin 14, 1-16.
- TRAUTWEIN, G. (1962): The occurrence of acid-fast lipopigments in animals. Am. J. vet. Res. 23, 134-145.
- VENIOLA, A.W. und TAPPEL, A.L. (1958): Brown-colored oxypolymers of unsaturated fats. J. of the Am. Oil Chemist Soc. 35, 135.
- WHITEHAIR, O.K., SCHAEFER, A. E. und ELVEHJEM, C.A. (1949): Nutritional deficiencies in mink with special reference to hemorrhagic gastroenteritis, "Yellow Fat", and anemia. J. Am. vet. med. Ass. 115, 54-58.
- WILHELM, H. (1968): Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung von Lipopigmenten nach einer einmaligen intravenösen Injektion einer Lebertranemulsion. Diss. Marburg 1968.
- WINNAIL, D.S. und WILLIAMS, W.L. (1968): Formation of ceroid in subcutaneous implants in mice. The anatomical Record, Vol. 160, No. 4, 759-772.
- WISSE, E. (1970): An electronmicroscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. J. Ultrastructure Res. 31, 125-150.

- WOLMAN, M. (1950): Staining of lipids by the periodic-acid-Schiff-reaction. Proc. Soc. exp. Biol. New York, 75, 583-585.
- WOLMAN, M. (1956): The lipids stained by the periodic-acid-Schiff-technique. Stain. Technol. 31, 241-245.
- WOLMAN, M. (1964): Histochemistry of lipids in pathology. In: Handbuch der Histochemie, Band V/2. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- WOLMAN, M. und SOSHAN, S. (1960): The chromolipids: Dependence of histochemical characteristic on the degree of polymerisation and their differentiation from DNA. Histochemie 2, 69-75.
- WRETTLIND (1972): Complete intravenous nutrition. S. 17-39. Basel: Karger Verlag.
- ZOLLINGER, H.U. (1953): Lokalisation und Bedeutung des Ceroidpigmentes. Schweiz. Z. allg. Path. 16, 1026-1040.

XIII. Nachwort

Herrn Prof. Dr. P. Gedigk danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ebenfalls spreche ich meinen Dank den Proff. Bechtelsheimer und Totovic für die Anleitung, die wertvollen Hinweise sowie für die redaktionelle Hilfe aus.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. von Sandersleben für die Übernahme des Korreferates.

Der MTA Frau H. Wecke danke ich für die technische Assistenz bei den Versuchen.

Lebenslauf

Am 20. Januar 1946 wurde ich als Sohn des im Jahre 1962 verstorbenen Regierungsdirektors Theo Weischer und seiner Ehefrau Maria Weischer geb. Pohl in Bonn geboren.

Nach vierjährigem Volksschulbesuch ging ich ab Ostern 1956 in Köln und ab Herbst 1960 in Bonn auf das Gymnasium. Am 1. März 1966 legte ich am Staatlichen Beethovengymnasium Bonn die Reifeprüfung ab.

Einem einsemestrigen Biologiestudium in Bonn schloß sich die tiermedizinische Ausbildung in Gießen und in München an. Das Physikum bestand ich am 7. März 1969 in Gießen und das Staatsexamen am 29. März 1972 in München.

Die Bestallung zum Tierarzt erhielt ich am 14. April 1972.

Vom 1. Juli 1973 bis zum 31. März 1975 war ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pharmakologischen Institut der Universität Bonn, wo ich auf dem Gebiet der Histopathologie wissenschaftlich tätig war. Während dieser Zeit habe ich vier histopathologische Veröffentlichungen (auf dem Gebiet der Entzündungsforschung), die im Druck sind, angefertigt.

Seit dem 1. April 1975 bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Toxikologie (Abt. Histopathologie) der Firma Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld.

